

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

INDUKTION UND ISOLIERUNG VON Ig G 1 UND Ig G 2
DES MEERSCHWEINCHENS :
UNTERSUCHUNGEN ZUM DETERMINANTENMUSTER DIESER
ANTIKÖRPER UND IHRER FRAGMENTE DURCH ERZEUGUNG
MONOSPEZIFISCHER ANTI-MEERSCHWEINCHEN-IMMUNGLOBULIN-
ANTIKÖRPER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus Weyer-Storz
aus Mainz

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0068

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

INDUKTION UND ISOLIERUNG VON IG G 1 UND IG G 2
DES MEERSCHWEINCHENS :
UNTERSUCHUNGEN ZUM DETERMINANTENMUSTER DIESER
ANTIKÖRPER UND IHRER FRAGMENTE DURCH ERZEUGUNG
MONOSPEZIFISCHER ANTI-MEERSCHWEINCHEN-IMMUNGLOBULIN-
ANTIKÖRPER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus Weyer-Storz
aus Mainz

Mainz 1979

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. G. Mann

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Hadding



1. Referent: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

2. Referent: Prof. Dr. U. Hadding

Meiner Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

<u>I EINLEITUNG</u>	Seite
1.) Antikörper und Komplement	1
2.) Die Komplementaktivierung	
a) der klassische Weg	3
b) der alternative Weg	4
3.) Ig G1 und Ig G2 des Meerschweinchens	
a) physikochemische Daten der Ig G1 und Ig G2	6
b) Auftreten von Ig G1 und Ig G2 nach Immunisierung	8
c) Komplement-Aktivierung durch Ig G1 und Ig G2	9
d) Unterschiede im biologischen Verhalten von Ig G1 und Ig G2	10
<u>II PROBLEMSTELLUNG</u>	12
<u>III MATERIAL UND METHODEN</u>	
1.) Immunisierung von Meerschweinchen und Beschreibung der verwendeten Antigene	15
2.) Testsysteme: Allgemeine und spezielle Nachweisverfahren für Antikörper	17
3.) Aufarbeitung der Antiseren	20
4.) Konzentrationsverfahren	25
5.) Herstellung monospezifischer Anti- seren	26
6.) Herstellung von Ak-Spaltprodukten	28
7.) Herstellung von Antiseren gegen Ig G1 und Ig G2 sowie deren Spaltprodukte	29
<u>IV ERGEBNISSE</u>	
1.) Die Herstellung von reinen Ig G1 und Ig G2	
a) schematischer Überblick	30
b) Gesamtantikörperausbeute durch	32

verschiedene Immunisierungs- verfahren	
c) das Ergebnis der DEAE-Säulen- chromatographie	33
d) Reinigung mit der Protein A- Säule	35
e) Reinigung mit der Anti-Ig G1- Immunabsorptionssäule	36
f) Reinigung mit der Präparativen Isoelektrischen Fokussierung	36
g) Reinigung mit der Präparativen Elektrophorese	37
h) Reinigung mit der Anti-Ig G2- Immunabsorptionssäule	38
i) Vergleich der Methoden zur Her- stellung reiner Ig G1 und Ig G2	41

2.) Weitere Bearbeitung der reinen Ig G1 und Ig G2

a) Immunisierung mit dem Gesamtmolekül	44
b) Spaltung mit Papain	45
c) Immunisierung mit Spaltprodukten	45
d) Antigenetische Untersuchungen	45

<u>V D I S K U S S I O N</u>	61
------------------------------	----

<u>VI Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	72
---	----

<u>VII L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S</u>	74
--	----

I E I N L E I T U N G

1.) Antikörper und Komplement

Antikörper (AK) sind Reaktionsprodukte des Makroorganismus auf einen antigenen Reiz. Nach ihren Determinanten auf der schweren Kette, ihrem Molekulargewicht (MG) und ihren biologischen Potenzen unterscheiden wir fünf Ak-Klassen, nämlich Ig A, Ig D, Ig E, Ig G, und Ig M in allen Säugetier-spezies.

Von Ig G und Ig M ist seit langem bekannt, daß sie nach Interaktion mit dem homologen Antigen (Ag) das Komplement-System aktivieren.(C) Die Aktivierung des C steigert die biologischen Leistungen im Sinne der Entzündungsvermittlung und Erregerabwehr.

Unter C subsummiert man zwanzig definierte Proteine des Blutplasmas, die in Form von vierzehn Komponenten (C1 bis C9, Faktor B, Faktor D und Properdin), und sechs Regulator-Proteinen vorliegen. Die Faktoren C1 bis C9 + Ak oder C3b, B und Properdin zusammen mit C5 bis C9 vermögen Zellen zu lysieren. Die Cytolyse tritt nach neueren Befunden hinter anderen biologischen Leistungen des C zurück, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

a) Beteiligung bei der Entzündung Histaminfreisetzung und Steigerung der Vasopermeabilität

Die Spaltprodukte C3a und C5a stellen Entzündungsmediatoren dar. Sie können aus Mastzellen Histamin freisetzen, das die Vasopermeabilität erhöht und eine kontrahierende Wirkung auf die glatte Muskulatur ausübt. Die Folgen sind Störungen der Mikro-

zirkulation bis zur Stase des Blutstromes und Ausbildung der für die Entzündung charakteristischen "red sludges".

C3a und C5a als Anaphylatoxine:

Als Anaphylatoxinwirkung hat man die Auslösung von Kontraktionen der glatten Muskulatur bezeichnet, wie sie in vitro am Ileum des Meerschweinchens getestet werden kann. Die Rezeptoren für C3a und C5a scheinen aber verschieden zu sein, da das Meerschweinchen-Ileum nach mehrmaliger Gabe von C3a eine Verminderung der Kontraktionsfähigkeit zeigt (Tachyphylaxie), nach anschließender Gabe von C5a jedoch die volle Kontraktionsfähigkeit zur Verfügung steht.

Leukotaxie und zelluläre Infiltration:

Ba, C3e und C5a locken weiße Blutkörperchen in das Zentrum der Entzündung und haben für die Leukozyten eine Wegweiserfunktion.

b) Beteiligung bei der Erregerabwehr

C2, C4 und C3 können zur Virusneutralisation beitragen, C3b bewirkt die Immunadhärenz an Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten. Man nimmt an, daß die auf der Zelle befindlichen C3-Rezeptoren durch Reaktion mit C3b die Verankerung auf der Zelloberfläche und damit die weitere Verarbeitung herbeiführen. Weiterhin ist C3b verantwortlich für die Opsonisierung, d.h. normalerweise kaum phagozytierbare Stoffe werden durch "Lackierung" mit C für Makrophagen aufnehmbar.

Die neunte Komponente führt zur Lyse von C-besetzten Erythrozyten, außerdem bewirkt C9 die Immunbakterizidie, d.h. die Abtötung von Ak-besetzten Bakterien nach Aktivierung des

C an der Oberfläche von Bakterien.

2.) Die Komplement-Aktivierung

a) Der klassische Weg

Komplement liegt normalerweise im Blut in einem präaktiven Zustand gemeinsam mit seinen potentiellen Reaktionspartnern, den Ak, vor, die ebenfalls als präaktiv zu bezeichnen sind. Nach der Reaktion des Ak mit dem Ag gewinnt der Ak im Verbund des Ag-Ak-Komplexes die Fähigkeit, C zu aktivieren, d.h., es in die biologisch aktive Zustandsform zu überführen. Durch eine Veränderung vorwiegend im Fc-Anteil des Ak werden Bindungsstellen freigelegt, an die sich die erste C-Komponente anlagern kann. Nach der Aktivierung von C1 erfolgt im Sinne einer Kaskadenreaktion die Aktivierung der übrigen C-Komponenten, die aber keinesfalls als streng stöchiometrische chemische Reaktion angesehen werden darf.

Die einzelnen Ak-Klassen verhalten sich in Bezug auf die C-Aktivierung sehr verschieden. Allein Ig G und Ig M sind in der Lage, C in der eben dargestellten Weise zu aktivieren.

Es scheint gerechtfertigt, sich den Aktivierungsmechanismus bis zum C5 hauptsächlich als eine Enzymwirkung vorzustellen. Die zu aktivierende Komponente erscheint dabei als Substrat und Proenzym, welches ein mehr oder minder großes Polypeptid verliert. Träger der entstehenden enzymatischen Aktivität wird der verbleibende Hauptteil, nicht das kleinere Bruchstück. Damit wird die aktivierte C-Komponente selbst zum Aktivator für die folgende.

Die terminalen C-Komponenten erlangen da-

gegen ihre biologische Aktivität nicht durch die Lösung von Peptidbindungen, sondern durch Wechselwirkung hydrophober Gruppen.

Der oben beschriebene Weg der C-Aktivierung galt lange Zeit als der einzig mögliche. Heute weiß man, daß er nur einer von mehreren Wegen ist. Nachdem die Enzymnatur der einzelnen Reaktionsschritte bekannt war, ließ sich schon aus theoretischen Gründen ableiten, daß eine C-Aktivierung auch auf andere Weise und nicht über C1 möglich sein müsse. Andere Zugänge zur C-Aktivierung wurden als "C1, C4, C2 - by pass" oder "C3 shunt activation" bezeichnet. Heute hat sich hierfür der Begriff "alternative pathway" eingebürgert, der dem klassischen Weg der C1-Aktivierung gegenübergestellt wird.

b) Der alternative Weg

C3 kann durch verschiedene Substanzen, die als Induktoren bezeichnet werden, über mehrere Reaktionsschritte aktiviert werden. Zu den Induktoren zählen Zymosan, Lipopolysachharide, besonders aus gram negativen Bakterien, und Kaninchenerythrozyten. C3 kann aber auch durch den (Fab)₂-Anteil von Ak aktiviert werden, wenn dieser als Immunkomplex mit dem zugehörigen Ag vorliegt. (7, 27, 28, 43)

Die Aktivierung von C3 durch Faktoren des alternativen Weges wird heute folgendermaßen gesehen: (11, 12) Im Blutplasma entsteht ständig eine außerordentlich kleine Menge von C3b durch den Einfluß von B und D auf natives C3 (11). Das so entstandene C3b kann im Verbund mit B, D und Properdin natives C3 in vermehrtem Maße spalten und wird als C3-Convertase C3bB bezeichnet. Die Wirkung der C3b abhängigen C3-Spaltung wird im Plasma

begrenzt durch die Anwesenheit der Regulatorproteine C3b-Inaktivator (C3bINA) und beta-1-H.

Die oben als Induktoren bezeichneten Stoffe führen zu einer Steigerung der C3-Spaltung, indem sie gebundenes C3b und C3b-BB - das Enzym - weitgehend vor dem Einfluß der Regulatorproteine schützen.

Das so an die Induktoren (Zymosan, Lipopolysachharide, Kaninchenerythrozyten) gebundene C3b stellt in diesem Zustand einen geschützten Rezeptor für B dar. Unter Mitwirkung von B bildet sich ein Komplex, bestehend aus C3b, Bb und einem weiteren im Plasma in nativen Zustand vorliegendem Protein, dem Properdin (P), das im Komplex als P vorliegt und stabilisierend wirkt. Dieser Komplex mit B im enzymatischen Zentrum kann C3 in C3a und C3b spalten.

Dieses so zusätzlich entstandene C3b kann sich seinerseits auf der Induktoroberfläche wieder zu einem C3b-B-Enzym entwickeln. Damit liegt eine positive Rückkoppelung vor, bei der C3 sowohl als Substrat dient, wie auch das Spaltprodukt als Kern eines neuen C3-spaltenden Enzyms wirkt. Damit kommt es zu einer Amplifikation des C3-Umsatzes. Außerdem wirkt C3 als Bindungsareal für C5. Dieses wird dann durch dasselbe C3b-B-Enzym gespalten.

Das Regulatorprotein beta-1-H verdrängt den Faktor Bin seiner aktivierten wie auch in seiner nativen Form von C3b und führt so zu einer Dissoziation des Enzyms. Das so von B freigesetzte C3b ist jetzt für die enzymatische Spaltung durch C3b-INA empfänglich

und damit durch die Zerlegung in C3c und C3d nicht mehr zur positiven Rückkoppelung fähig.

Die Aktivierung von B zu B' kann als enzymatische Reaktion angesehen werden. Der Faktor D kann bei der B-Aktivierung durch verschiedenen Enzyme wie Plasmin, Trypsin und Pro-nase ersetzt werden (11).

3.) Ig G1 und Ig G2 des Meerschweinchens

a) Physikochemische Daten der Ig G1 und der Ig G2

Von den eingangs erwähnten Ak interessieren hier für die vorliegende Arbeit nur die Ig G mit einem Molekulargewicht (MG) von etwa 150 000 Dalton, einem Kohlenhydratanteil von etwa 3,5% und einer Sedimentationskonstanten von 7 S.

Bei der Elektrophorese von Ig G des Meerschweinchens verhalten sich die 7 S-Ak heterogen, d.h. sie wandern nicht gleichmäßig weit. Dieses Verhalten führte zur Unterscheidung in Ig G1, die weiter anodisch bzw. weniger weit kathodisch wandern, und in Ig G2, die weiter kathodisch wandern. (2) Dieses unterschiedliche Verhalten hat sein biochemisches Korrelat in einer verschiedenen Menge an sauren Aminosäuren. Bei den Ig G1 überwiegt der Anteil der sauren Aminosäuren über den der Ig G2. (23) Die erwähnten Unterschiede finden sich in der Aminosäuresequenz der schweren Kette dieser Ak und zwar besonders im Bereich der Fc-Anteile. (29, 39)

Es ist in der Literatur beschrieben worden, daß man durch Gewinnung von Anti-Ig G1- und Anti-Ig G2-Immunseren und anschließende Absorption von Anti-Ig G1 mit Ig G2 und

von Anti-Ig G2 mit Ig G1 depletierte Seren erhalten könne, die spezifisch für die Fc-Anteile von Ig G1 und Ig G2 seien. (50)

Innerhalb der Ig G1- und der Ig G2-Gruppe findet sich eine Heterogenität, so daß mindestens zwei Subgruppen von Ig G1 und Ig G2 vorliegen, die als Ig G1a und Ig G1b sowie als Ig G2a und Ig G2b bezeichnet werden. Die Ak dieser Subgruppen unterscheiden sich bei der Elektrophorese in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit: Ig G1a wandert schneller anodisch als Ig G1b, was durch den unterschiedlichen Aufbau des Fc-Anteils bedingt ist. Ig G2a wandert weniger weit kathodisch als Ig G2b. Hier liegen dagegen die Unterschiede in der Fab-Portion der Ak. (39)

Verhalten der L-Ketten:

Im normalen unbehandelten Meerschweinchen-serum findet man ein Verhältnis der kappa-zu den lambda-Ketten von 2:1. Elektrophoretisch wandert die kappa-Kette langsamer anodisch als die lambda-Kette. Bei der Immunisierung von Meerschweinchen z.B. mit DNP-konjugierten Proteinen kann, in Abhängigkeit vom verwendeten Ag, das kappa-lambda-Verhältnis fast völlig auf die Seite der kappa-Kette verlagert werden. Mit anderen Ag dagegen kann die Bildung der lambda-Ketten bevorzugt werden. (36) Das MG der leichten Kette beträgt 25 000 Dalton. (23)

Die biologische Halbwertszeit von Ig G1 und Ig G2

Die biologische Halbwertszeit wurde mit ^{131}I -markierten Ag in vivo für Ig G1 mit 7,1 Tagen und für Ig G2 mit 5,1 Tagen bestimmt. (30)

b) Auftreten von Ig G1 und Ig G2 nach Immunisierung

Die von den Plasmazellen gebildete Menge von Ig G1 und Ig G2 ist von verschiedenen Faktoren abhängig: von der Zeit, die für die Immunisierung zur Verfügung stand, von der Verwendung von Adjuvans und von der Art des verwendeten Ag.

Der Einfluß der Zeit zeigt sich darin, daß in der Frühphase der Immunisierung vornehmlich Ig G2 gebildet wird, mit zunehmender Immunisierungszeit dagegen Ig G1.

Bei der Verwendung von komplettem Freund'schen Adjuvans liegt das Schwergewicht auf der Bildung von Ig G2. Wird das Ag ohne Adjuvans nur in physiologischer Kochsalzlösung verabreicht, steigt der Anteil von Ig G1.

Der Einfluß des Ag selbst macht sich bemerkbar, wenn einmal DNP-konjugiertes Albumin, ein anderes mal DNP-konjugiertes Immunglobulin verwendet wurde. Im ersten Fall werden bevorzugt Ig G2 gebildet, im zweiten dagegen Ig G1, dennoch überwiegen quantitativ hier immer noch die Ig G2. (36)

Der Wechsel der Bildung von Ig G1 und Ig G2 ist mit einem Wechsel der zur Antikörperbildung befähigten Zellpopulation verbunden, wie Lymphknotenbiopsien beweisen. (36)

Die Serumkonzentration von Ig G1 beträgt 0,3 bis 1,0 mg/ml, von Ig G2 7,0 bis 10 mg/ml.
(3)

c) Die C-Aktivierung durch Ig G1 und Ig G2:
Ig G1 aktiviert als Ag-Ak-Komplex C3 mit Hilfe der Faktoren des alternativen Weges unter Umgehung der Komplement-Komponenten C1, C4 und C2. Als Ursache für das Ausbleiben der C1-Aktivierung ist ein fehlender Bindungsort für C1 am Fc-Anteil des Ak anzunehmen. Für die Aktivierung von C3 bis C9 ist lediglich Mg^{++} erforderlich. Andere zweiwertige Ionen können das Mg^{++} nicht ersetzen. Der C-Verbrauch, gemessen am Verlust hämolytischer Potenzen erfolgt schnell. (43)

Im Gegensatz zu Ig G1 aktiviert Ig G2 nach Reaktion mit dem homologen Ag das C-System auf zwei Wegen, nämlich über den alternativen Weg und auf dem sog. klassischen Weg. (44)

Die Aktivierung über den alternativen Weg erfolgt wie für Ig G1 oben beschrieben, wobei sich die für die Aktivierung verantwortliche Region auf dem Fab-Anteil befindet.

Die Aktivierung auf dem klassischen Weg erfolgt durch Aktivierung von C1 zu $C1$. Die aktive Region liegt im Fc-Abschnitt des Ak. Im Hinblick auf den Bedarf an zweiwertigen Ionen ist bei Ig G2 festzustellen, daß bei alleiniger Gabe von Mg^{++} nur ein Verbrauch von C3 bis C9 erfolgt. Bei Gabe von Mg^{++} und Ca^{++} ist ein Verbrauch von C1 bis C9 feststellbar, da die Aktivierung von C1 Ca^{++} abhängig ist. (43)

d) Unterschiede im biologischen Verhalten von Ig G1 und Ig G2

Ig G1 sind verantwortlich für lokale und systemische anaphylaktische Reaktionen, die im Meerschweinchen unter anderem das Ergebnis der Histaminfreisetzung aus Mastzellen sind. Man glaubt, daß diese Ig G1 spezifische Bindungsareale für Meerschweinchen-Mastzellen besitzen. Diese werden im Bereich des Fc-Abschnitts der Ak vermutet. Infolge des Fehlens von C1-bindenden Rezeptoren können sie jedoch nicht C1 aktivieren. Deshalb können beispielsweise Ig G1, die gegen Hammelerythrozyten gerichtet sind, keine Lyse dieser Zellen in Gegenwart von C über C1 bewirken. (1,4)

Die Ig G1 besitzen auch keine sog cytophilien Areale für Makrophagen. Unter Cytophilie versteht man die Fähigkeit der Ak, sich an Makrophagen anzulagern, wodurch diese für bestimmte, vom Organismus als fremd erkannte Stoffe, sensibilisiert werden (sog. passive Armierung). (31)

Im Gegensatz dazu sind Ig G2 nicht in der Lage, sich an Mastzellen zu binden, d.h. sie stellen keine sog. cytotropen Ak dar. Ig G2 können deswegen direkt kein Histamin freisetzen, sondern werden im Gegenteil dazu benutzt, die Histaminfreisetzung zu blockieren, indem sie mit Ig G1 in Konkurrenz um das Ag treten und gegebenenfalls Ig G1 kompetitiv verdrängen. Durch den Besitz von C-bindenden Arealen auf dem Fc-Anteil können Ig G2 C1 aktivieren und können spezifisch sensibilisierte Zellen in Gegenwart von C lysieren. Daneben finden sich auf dem Fc-Abschnitt noch die bereits oben erwähnten Areale für die Bindung an Makrophagen. (36)

Das Auftreten dieser Unterschiede muß als artspezifisch angesehen werden, da sich andere Spezies völlig anders verhalten, so z.B. die Maus, bei der beide Ak eine hohe Affinität zu Mastzellen besitzen. (26)

II P R O B L E M S T E L L U N G

Wie oben ausgeführt gibt es eine Reihe exogener Induktoren für die Aktivierung des alternativen Weges. Ein endogener Aktivator ist dagegen Ig G1.

Gereinigte Ig G1 können helfen, die Frage zu klären, ob sich die physiologischen Aktivatoren genauso verhalten wie z.B. das Zymosan und ob die gleichen Reaktionsschritte ablaufen.

Um die hämolytischen Potenzen des alternativen Weges zu ermitteln, bieten sich Ig G1 und Ig G2 an, die gegen zelluläre Ag gerichtet sind.

Die Voraussetzungen zur Lösung der eben skizzierten Probleme sollen mit der vorliegenden Arbeit geschaffen werden. Es ist deshalb ihr Ziel, Ig G1 und Ig G2 zu erzeugen und rein darzustellen. Da die von Oliveira et al. (40) angebotene Methode zur Trennung der beiden Ak hier nicht zu befriedigenden Ergebnissen führte (Ig G1 konnte nicht in hinreichend großen Mengen frei von Ig G2 erhalten werden), sollen verschiedene andere Trennungsv Verfahren im Hinblick auf ihre erreichbare Ausbeute von reinem Ig G1 und reinem Ig G2 erprobt und verglichen werden.

Es sollen deshalb gegen definierte Ag gerichtete Ak erzeugt und getrennt werden. Bei der Aufarbeitung sollen verschiedene Methoden und Verfahren zur Anwendung kommen. Als Ag bieten sich DNP (Dinitrophenol)-konjugierte Proteine sowie gewaschene Hühnererythrozyten an. Die erhaltenen Ig G sollen gespalten und die erhaltenen Fc- und Fab-Anteile isoliert

werden, um damit Anti-Fc- und Anti-Fab- Immunsere zu erzeugen.

Mit derart gewonnenen monospezifischen Ig G1 und Ig G2 Antikörpern und Ak-Fragmenten ergibt sich die Möglichkeit, C auf dem klassischen und alternativen Weg zu aktivieren. Durch die Bildung von gegen zelluläre Ag gerichteten Ak ist es möglich, die hämolytische Potenz des alternativen Weges zu ermitteln.

Schließlich bieten sich die erzeugten Anti-Immunglobulin-Antiseren für Untersuchungen zum Determinantenmuster der Ig G1 und Ig G2 sowie deren Fragmente an.

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
BSA	Serumalbumin vom Rind
C	Komplement
C3b-INA	C3b-Inaktivator
DNP-BGG	an Gammaglobulin vom Rind gekoppeltes Dinitrophenol
DNP-HSA	an Serumalbumin vom Menschen ge- koppeltes Dinitrophenol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Ig G	Immunglobulin
MG	Molekulargewicht
MS	Meerschweinchen
PEPH	Präparative Elektrophorese
PIEF	Präparative Isoelektrische Fo- kussierung
Seph-Br-Cn	mit Brom-Cyan aktiviertes Sepharosegel
VBS-EDTA	Physiologische Kochsalzlösung, die 0,05 M Veronalpuffer pH 7,5 enthält

III MATERIAL UND METHODEN

1.) Die Immunisierung von Meerschweinchen

Es wurden 350 Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 350 bis 450 g verwendet. Es handelte sich nicht um Inzucht-Tiere. Die Immunisierung erfolgte mit:

- a) DNP-HSA (Dinitrophenol, das an menschliches Albumin gekuppelt war)
- b) DNP-BGG (Dinitrophenol, das an Rinder-Immunglobulin gebunden war)
- c) Hühnererythrozyten mit komplettem Freund'schen Adjuvans
- d) Hühnererythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung

Die DNP-konjugierten Proteine wurden bei der Firma Calbiochem, Californien, USA gekauft.

Zu a): Die Erstimmunisierung erfolgte mit 1 mg Ag/Tier. Das Ag war in 0,5 ml 0,15 M NaCl gelöst und mit 0,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans vermischt. Die Impfung erfolgte in die vier Fußballen, wobei je Fuß 250 μ l appliziert wurden. Die Boosterung der Tiere erfolgte nach einundzwanzig Tagen mit 60 μ g des Ag, das in 0,15 M NaCl gelöst war, durch Injektion in die Leistenregion. Die Tiere wurden acht Tage nach der Boosterung getötet und das Blut aus den eröffneten Carotiden gewonnen.

Zu b): Die Erstimpfung erfolgte mit 1 mg Ag/Tier. Das Ag war in 1 ml 0,15 M NaCl gelöst. Jedes Tier erhielt pro Fußballen 250 μ l des Ag. Nach 21 Tagen erfolgte die Boosterung mit 60 μ g des Ag, das in 1 ml 0,15 M NaCl gelöst war, durch Injektion in

die Leistenregion. Die Boosterung wurde in wöchentlichem Abstand zweimal wiederholt. Acht Tage nach der letzten Boosterung wurde das Blut wie oben beschrieben gewonnen.

Zu c): Ausgewachsene Hühner wurden im Bereich der großen Flügelvenen punktiert. Mit Kanülen der Größe 12 wurden bis zu 35 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in VBS-EDTA (mit Veronalpuffer pH 7,5, 0,05 M gepufferte physiologische Kochsalzlösung, die 0,01 M Äthylendiamintetraessigsäure enthielt) aufgenommen. Die Blutkörperchen wurden anschließend zehnmal in 0,15 M NaCl gewaschen. Die weißen Blutkörperchen, die nach dem Zentrifugieren als Schicht über den gepackten Erythrozyten lagen, wurden mit einer Pasteur-Pipette entfernt. Danach wurde eine 30 %ige Hühner-Erythrozyten-NaCl-Suspension hergestellt. Jedes Meerschweinchen erhielt 125 µl Ag, das mit 125 µl komplettem Freund'schen Adjuvans vermischt war, in jeden Fußballen verabreicht. Die Boosterung erfolgte nach 21 Tagen durch Injektion einer 10 %igen Hühner-Erythrozyten-NaCl-Suspension in die Leistenregion. Acht Tage nach der letzten Boosterung wurden die Tiere getötet und das Blut gewonnen.

Zu d): Die Aufbereitung der Hühner-Erythrozyten erfolgte wie unter c) beschrieben. Es wurde eine 10 %ige Hühner-Erythrozyten-NaCl-Suspension hergestellt. Jedem Tier wurden 250 µl Ag in jeden Fußballen injiziert. Nach 21 Tagen erfolgte die Boosterung mit der gleichen Ag-Menge durch Injektion in die Leistengegend. In wöchentlichem Abstand folgte eine zweimalige Wiederholung der Boosterung. Acht Tage nach der letzten Boosterung

wurden die Tiere getötet und das Blut gewonnen.

2.) Testsysteme

A Allgemeine Nachweisverfahren für Antikörper

a) Agargel-Diffusionstest nach Ouchterlony

Die Ausführung erfolgte auf Glas-Objektträgern, die mit 1 %iger Agarose in Veronalpuffer (0,1 M, pH 8,6) + 0,001 M EDTA + 0,01 % Na-Azid beschichtet waren. Das Auftragen der Agarose sowie das Ausstanzen der Löcher erfolgte mit Hilfe der von der Firma Gelman, Michigan, USA, hergestellten Geräte. Der Probenauftrag betrug stets 10 µl, die Diffusionszeit zwischen 24 und 48 Stunden. Danach wurden die Objektträger zwei Tage lang in 1 %iger NaCl-Lösung, der 0,01 % Na-Azid zugesetzt war, gespült. Einem anschließenden zweistündigen Waschen in Wasser folgte die Trocknung bei Zimmertemperatur. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brillant-Blue R 250 (Serva, Heidelberg). Die Färbezeit betrug zwei Stunden. Das Entfernen überflüssiger Farbe erfolgte mit einem Methanol-Eisessig-Gemisch (4:1).

b) Die Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in 1 %igem Agarosegel (Zusammensetzung siehe unter a)) auf Glas-Objektträgern durchgeführt. Es wurden immer 10 µl der Probe aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei 4°C zwei bis drei Stunden bei 8 V/cm. Anschließend wurde das Antiserum eingefüllt, und die Präzipitationslinien 24 bis 48 Stunden entwickelt. Nach der Elution von nicht präzipitiertem Protein in 1 %iger NaCl-Lösung erfolgte die Färbung und Entfärbung wie unter a) beschrieben.

c) Die Proteinbestimmung nach Lowry

Die Eiweißbestimmung nach Lowry, 1951, erfolgte mit 100 μ l der Probe. Diese wurde zehn Minuten bei 37°C inkubiert mit zwei Milliliter einer Natriumcarbonat-Lösung, die auf 100 ml 1 ml Cu_2SO_4 und 1 ml Na-K-Tartrat enthielt. Nach der Zugabe von 200 μ l Folin-Reagenz (E. Merck, Darmstadt) wurde der Reaktionsansatz dreißig Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend photometrisch die Extinction bei 578 nm gegenüber dem Leerwert bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve.

B Spezielle Nachweisverfahren

a) Die Bestimmung von Antikörpern gegen Hühner-Erythrozyten

Hühner-Erythrozyten wurden 10 x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. 10 μ l der abzentrifugierten gepackten Erythrozyten wurden in 1 ml physiologische Na-Cl-Lösung suspendiert. Dies entsprach einer Zellzahl von 7×10^6 Zellen/ml, wenn man die oben angegebene Erythrozyten-Suspension in der Zählkammer auszählte. Parallel dazu wurde nach osmotischer Wasser-Lyse der Hämoglobingehalt photometrisch bestimmt, und eine Eichkurve aufgestellt. Bei Wiederholungen des Versuchs brauchte dann nur die nach Wasser-Lyse erhaltene Hämoglobinmenge bestimmt zu werden, um die Zellzahl zu ermitteln.

Die Testung der Antikörper erfolgte auf Mikrotiterplatten, in deren Löcher zunächst 25 μ l VBS-EDTA einpipetiert wurden. Die Antiseren wurden in diesem Puffer fortlaufend verdünnt,

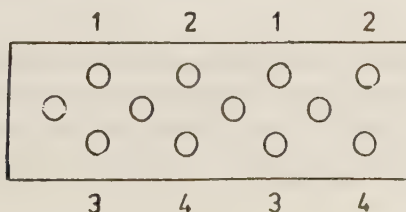
so daß sich eine arithmetische Verdünnungsreihe ergab. Mittels einer Tropfpipette wurden die Hühner-Erythrozyten zugetropft und anschließend 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als positiv wurde nur die vollständige Agglutination bewertet.

b) Bestimmung von Antikörpern gegen DNP-HSA oder DNP-BGG

Es wurden tannisierte Hühner-Erythrozyten verwendet. Zur Tannisierung wurde eine 0,05 %ige Tannin-Lösung in PBS (0,15 M NaCl, 10 ml 0,05 M Phosphat-Puffer pH 7,5 pro Liter enthaltend) hergestellt. 260 μl gepackte Erythrozyten/10 ml PBS wurden mit der Tannin-Lösung zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Ein Volumen der tannisierten Erythrozyten wurde mit einem Volumen der zu kuppelnden Proteinlösungen, die eine Konzentration von 1 mg/ml 0,15 M NaCl hatten, bei 4°C über Nacht geschüttelt. Es folgte eine 20 Minuten dauernde Inkubation bei 37°C , und ein zweimaliges Waschen in VBS-EDTA. Die nun gebrauchsfertigen Erythrozyten wurden in einer 0,15 %igen 0,15 M NaCl-BSA-Lösung aufbewahrt. (BSA: Serumalbumin vom Rind) Die Auswertung erfolgte wie unter a) beschrieben auf Mikrotiterplatten.

c) Bestimmung von Ak gegen DNP-HSA oder DNP-BGG im Agargeldiffusionstest

Auf einem mit Agarosegel beschichteten Objektträger wurden in folgender Anordnung Löcher gestanzt:



In die mittlere Lochreihe wurde das Antigen in einer arithmetischen Verdünnungsreihe eingefüllt, beginnend mit der konzentrierten Lösung mit 1 mg/ml, dann 1:2 usw. In die obere und untere Lochreihe wurde das Antiserum wie folgt eingippt: 1 = konzentrierte Lösung, 2 = 1:2, 3 = 1:4, 4 = 1:8. Als positiv wurde eine nach der Färbung sichtbare Bande gewertet. Fand sich auf einem Objektträger kein negativer Befund, so wurde der Versuch in der gleichen Anordnung wiederholt, das Antiserum aber schon 1:8 vorverdünnt ins Loch Nr. 1 eingippt.

d) Semiquantitative Bestimmung des Ig G1-
Ig G2-Gehaltes von Lösungen

Um den Ig G1- oder Ig G2-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde ein mit Agarosegel beschichteter Objektträger in der gleichen Weise wie oben beschrieben gestanzt. In die mittlere Lochreihe wurde die zu untersuchende Lösung in steigender Verdünnung eingippt, in die Löcher 1 und 2 jeweils die gleiche Menge eines konzentrierten Anti-Ig G1-Antiserums oder eines Anti-Ig G2-Antiserums, in die Löcher 3 und 4 stets die gleiche Menge einer 1:2 oder 1:4 verdünnten Lösung des gleichen Antiserums. Die Bewertung erfolgte wie unter c) beschrieben.

3. Aufarbeitung der Antiseren

a) Ionenaustauscherchromatographie mittels
DEAE

Die Aufarbeitung der Antiseren erfolgte mit DEAE-Anionenaustauschern der Firma Whatman (DE 52). Das Antiserum wurde zunächst mit der gleichen Menge einer wässrigen, gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung,

pH 7 in der Kälte gefällt, um die Albumine abzutrennen. Nach einer Kältezentrifugation wurde das Präzipitat in 0,15 M NaCl aufgelöst, gegen 0,15 M NaCl dialysiert und in der Kälte zentrifugiert. Es folgte eine Dialyse gegen 0,005 M Na-Phosphat-Puffer, Die nun präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert, der klare Oberstand auf eine DEAE-Säule aufgetragen, die zuvor mit 0,005 M Na-Phosphat-Puffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte entweder durch schrittweises Erhöhen der Ionenstärke und gleichzeitiges Senken des pH oder durch kontinuierliche Erhöhung der Ionenstärke bei gleichbleibendem pH wie folgt:

Schrittweises Vorgehen:

pH 8 0,005 M

pH 6,3 0,01 M

pH 6,0 0,04 M

pH 5,8 0,1 M

pH 5,4 0,3 M

Kontinuierlicher Verlauf:

pH 8,0 0,005 M bis 0,3 M

Die Ig G2 hafteten nicht auf der Säule, die Ig G1 wurden bei pH 6,0 und 5,8 bzw. zwischen 0,1 und 0,3 M eluiert. Die Eluate wurden auf jeweils 10 ml konzentriert und bei -70°C aufbewahrt.

b) Die Präparative Isoelektrische Fokussierung (PIEF)

Die Präparative Isoelektrische Fokussierung (PIEF) ist ein Trennverfahren, bei dem in einem stabilen pH-Gradienten amphotere Substanzen,

also auch Proteine und Peptide aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (IP) getrennt werden. Jede amphotere Substanz hat einen IP, definiert als das pH, bei dem die elektrophoretische Wanderung gleich Null ist. Wird in einem elektrischen Feld durch Elektrolyse sogenannter Trägerampholyte ein stabiler pH-Gradient aufgebaut, der von der Kathode (-) bis zur Anode (+) monoton ansteigende pH-Werte aufweist, so werden amphotere Substanzen an einem pH-Wert, der ihrem IP entspricht, gesammelt, d. h. fokussiert werden.

Die PIEF wurde in der Doppel-Dünnschicht-Chromatographie-Kammer der Firma Desaga, Heidelberg, ausgeführt. In einem 1,5 x 20 x 40 cm messenden Quarzglasrog wurden 400 ml einer wie folgt zusammengesetzten Gelsuspension eingefüllt:

388,0 ml Aqua dest.

16,0 g Sephadex G 75 Superfine

12,4 ml Trägerampholyte (Serva, Heidelberg)
pH 4-6

Der so beschickte Trog wurde bei Zimmertemperatur auf einem horizontal ausbalancierten Tisch zum Trocknen aufbewahrt. Die Trocknung wurde beendet, wenn sich am Rande des Glasroges in der Gelmasse feinste Risse zeigten, was je nach Luftfeuchtigkeit nach drei bis sechs Stunden der Fall war.

An beiden Stirnseiten des Troges wurden mit dem Löffel zwei 1,5 cm breite Gräben ausgehoben, in die mehrere Streifen eines 20 x 1,5 cm breiten Fließpapiers eingelegt wurden, die zuvor mit 0,3 M H_3PO_4 für die Anode und 0,4 M Aethylendiamin für die Kathode getränkt worden waren.

Die gut gegen einen niedermolaren (ca. 0,001 M) Phosphatpuffer dialysierten Proben wurden mittels Objektträger auf die Geloberfläche an einem beliebigen Punkt senkrecht zur Stromrichtung aufgetragen, indem der mit ca. 50 μ l beladene Objektträger schräg auf die Geloberfläche gesetzt wurde. Durch Kapillarkräfte wurden die Proben in Sekundenschnelle vom Gel aufgenommen. Die Applikation wurde 20 bis 25 mal wiederholt. Als Markerprotein diente eine konzentrierte Hammel-Hämoglobin-Lösung, die durch hypotone Hämolyse von Hammelerythrozyten gewonnen wurde.

Der Trog wurde in die auf 4°C vorgekühlte Desagakammer eingebracht, und zwei Platinbreitbandelektroden auf die Fließpapierstreifen aufgelegt. Für die Fokussierung wurde ein Spannungsgradient von 10 V/cm gewählt, d. h. also 400 V, bei dem das Amperemeter eine Stromstärke von 25 - 50 mA, je nach Feuchtigkeitsgehalt der Gelsuspension, anzeigte. Nach dem Abfall der Stromstärke auf ca. 20 % des Ausgangswertes (was regelmäßig nach 6 - 8 Stunden der Fall war), wurde die Spannung um den Faktor 3 erhöht, d. h. auf 1200 V. Die Fokussierung wurde beendet, wenn die Stromstärke erneut auf 20 % abgesunken war, und sich die Markerbanden als scharf begrenzte Linien abzeichneten.

Der Trog wurde sofort auf Millimeterpapier gelegt, dessen nachgezogene Linien durch das Gel hindurchschimmerten. Mit dem Spatel wurden ca. 1 cm breite Gelstreifen senkrecht zur Stromrichtung ausgehoben und in Zentrifugengläser gefüllt. Eine kleine Portion eines jeden Streifens wurde mit ca. 2 ml Aqua dest. überschichtet, geschüttelt und mittels Glaselektrode das pH bestimmt.

Die Hauptportion jedes Streifens wurde bei 5000 U/min abzentrifugiert, und der Oberstand sofort dekantiert und aufbewahrt. Der Oberstand jedes Streifens wurde in der Immundiffusion gegen definierte Antikörper getestet. Die so erhaltenen Proteine wurden gegen einen physiologischen Puffer dialysiert, um noch vorhandene Trägerampholyte zu eliminieren, und anschließend konzentriert.

c) Die Präparative Elektrophorese (PEPH)

Die Präparative Elektrophorese (PEPH) wurde in 1 %igem Agarosegel in Veronalpuffer (vgl. III 2 a) durchgeführt. Ein Quarzglasstrog mit den Abmessungen 20 x 20 x 1 cm wurde mit dem Agarosegel gefüllt, wobei an zwei gegenüberliegenden Seiten des Troges je zwei Fließpapierelektroden 20 x 5 cm eingegossen wurden, wobei sich eine nahe dem Trogboden, die andere nahe der Geloberfläche befand. Noch vor dem Erstarren des Gels wurde etwa in der Trogmitte, parallel zu den Fließpapierelektroden, eine 15 x 0,5 x 0,5 cm große Mulde angelegt, indem eine entsprechend große Glasscheibe, die an einem über dem Trog liegenden Waagebalken befestigt war, in die sich abkühlende Agarose eintauchte. Nach dem Erkalten des Gels ließ sich die Glasplatte mühelos entfernen.

Die Elektrophorese wurde bei 4°C in der Desage-Dünnschichtchromatographiekammer durchgeführt, nachdem die zu trennende Proteinlösung in die Mulde eingefüllt war. Als Marker fand Hämoglobin vom Hammel oder Eosin Verwendung. Die Laufzeit betrug zwischen 18 und 24 Stunden bei einem Spannungsgradienten von 20 bis 25 V/cm.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel sofort senkrecht zur Stromrichtung in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, die anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße eingefüllt wurden. Diese wurden mindestens sechs Stunden lang bei -70°C aufbewahrt und anschließend sofort bei 37°C aufgetaut. Es folgte eine sechsmalige Wiederholung des Einfrierens/Auftauens, um die Gitterstruktur des Agarosegels zu zerstören. Danach wurden die Reaktionsgefäße bei 7000 U/min drei Minuten lang zentrifugiert, und die Oberstände abpipetiert. Der Oberstand von je einem Agarosestreifen wurde im Ouchterlony-Test gegen definierte Antiseren getestet, um die Identität der aufgetrennten Proteinlösung zu ermitteln.

Nach der Konzentrierung der Oberstände auf das Ausgangsvolumen und nach einer ausgiebigen Dialyse gegen physiologischen Puffer wurden die Lösungen eingefroren.

4. Konzentrationsverfahren

a) Die Desaga-Unterdruckanlage

Zur Konzentrierung größerer Mengen (bis 5000 ml) wässriger Proteinlösungen wurden diese in ca. 1 m langen Dialyseschläuchen des Kalibers 12 mm einem Unterdruck von einer Atmosphäre ausgesetzt. Die konzentrierten Lösungen wurden in kleinen Glasfläschchen aufgefangen.

b) Kollodium-Hülsen

Kleinere Mengen wässriger Proteinlösungen (bis 50 ml) wurden in Kollodium-Hülsen der Firma Sartorius-Membranfilter, Göttingen, durch Anwendung von Unterdruck konzentriert.

c) Minicon Ultramembranfilter

Zur Konzentrierung kleinster Mengen und niedermolekularer Spaltstücke von Antikörpern (Fc-Anteil, Fab-Anteil) wurden Minicon B-Systeme der Firma Amicon, Witten, verwandt. Für Proteine mit einem MG von mehr als 15 000 kam der Typ B-15 zur Anwendung, dessen Abtrenngrenze bei etwa 15 000 Dalton liegt. Proteine mit einem MG von mehr als 100 000 wurden im System S-75 konzentriert, dessen Abtrenngrenze bei einem MG von ca. 75 000 liegt.

Neben der Möglichkeit der Konzentrierung boten die verwendeten Systeme noch die Möglichkeit, grob nach dem MG zu trennen.

5. Herstellung monospezifischer Antiseren

a) Absorption mit Protein A

Um reine Immunglobuline zu erhalten, wurde Protein A aus *Staph. aureus*, gebunden an Sepharose-CN-4 B, verwandt, das bei der Firma Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg, bezogen wurde.

Eine mit Protein A-Sepharose gefüllte Säule wurde mit Na-Phosphat-Puffer pH 8,0, 0,01 M äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde mit diesem Puffer gespült, darauf mit 0,5 M NaCl die unspezifisch an Protein A-Sepharose gebundenen Proteine abgelöst. Mit 2 M NaSCN wurden die spezifisch gebundenen Immunglobuline abgelöst und sofort um den Faktor 5 in Äquilibrierpuffer verdünnt. Gegen diesen Puffer erfolgte eine 24 stündige Dialyse. Das Dialysat wurde auf 1 ml konzentriert.

b) Absorption mit Sepharose-Brom-Cyan-Konjugaten (Sepharose-Br-Cn)

Zur Herstellung monospezifischer Antiseren gegen DNP-Albumin und DNP-Immunglobulin wurde Brom-Cyan aktivierte Sepharose der Firma Deutsche Pharmacia, Freiburg, verwandt. Die Koppelung von DNP-HSA oder DNP-BGG erfolgte mit dem in 0,001 M HCl pH 2-3 gequollenen Br-Cn aktivierten Sepharose-Gel durch zweistündiges Schütteln der in 0,1 M NaHCO₃ gelösten Proteine. Nach der Koppelung freigebliebene reaktive Stellen der Br-Cn-Sepharose wurden durch zweistündiges Schütteln mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8, abgesättigt. Es folgte ein fünfmaliges Waschen des Gels mit alternierend 0,1 M Acetat-Puffer pH 4, der 1 M NaCl enthielt, und 0,1 M Borat-Puffer, pH 8, der 1 M NaCl enthielt. Abschließend wurde mit 2 M NaSCn gespült (200 bis 300 ml) und mit Na-Phosphat-Puffer 0,02 M, pH 8, äquilibriert.

Die Absorption und Elution der Immunseren erfolgte in der für Protein A beschriebenen Weise.

Um das gegen das 'Hapten "DNP" gerichtete Immunserum zu isolieren, wurde das Antiserum der Charge Anti-DNP-HSA über eine Sepharose-Br-Cn-DNP-BGG-säule geschickt, das Antiserum der Charge Anti-DNP-BGG über eine DNP-HSA konjugierte Säule.

Herstellung von Ig G1- Ig G2-Sepharose-Br-Cn-Konjugaten und Anti-Ig-G1- und Anti-Ig G2-Sepharose-Br-Cn-Konjugat-Immunabsorptionssäulen: Die Koppelung, Absorption und Elution der Ak an Sepharose-Br-Cn-Konjugaten erfolgte wie oben beschrieben.

c) Absorption mit glutarisierten Hühner-Erythrozyten

Um monospezifische Antiseren, die gegen Hühner-Erythrozyten gerichtet waren, zu erhalten, wurden Hühner-Erythrozyten mit 0,25 %igem Glutaraldehyd fixiert. Nach zehnmalem Waschen der Erythrozyten wurden diese in 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 so suspendiert, daß 1 Vol. Erythrozyten auf 1 Vol. Tris-HCl-Puffer kam. Diese Suspension wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,25 %igem Glutaraldehyd dreißig Minuten bei 37°C inkubiert, danach zentrifugiert und in VBS, das 1 % Rinderalbumin enthielt, resuspendiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde der Puffer gewechselt. Die Fixierung der Erythrozyten wurde geprüft, indem sie hypo- und hypertonen Salzlösungen ausgesetzt wurden, und mikroskopisch die Konstanz der Zellmorphologie kontrolliert wurde.

Zum Gebrauch wurden die glutarisierten Erythrozyten mehrmals in Na-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Immunabsorption erfolgte in der für Protein A beschriebenen Weise.

6. Herstellung von Ig G2 Spaltprodukten

Ig G2 wurde mit einer handelsüblichen Papain-Lösung (Serva, Heidelberg) in seine Fc- und Fab-Spaltprodukte zerlegt. Die zu spaltenden Antikörper wurden gegen einen 0,09 M Phosphat-Puffer pH 7, der 0,05 M NaCl enthielt, dialysiert. Der Proteinlösung wurde Cystein bis zu einer Endkonzentration von 0,01 M und EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,002 M zugesetzt. Die Proteinmenge pro Versuchsansatz lag zwischen 75 und 100 mg, die eingesetzte Papain-Menge betrug stets 100 mg. Nach einer 22stündigen Inkubation bei 37°C wurde die Spaltung beendet. Es folgte eine Dialyse in der Kälte gegen einen Borat-Puffer (0,05 M, pH 7,5),

der mit NaCl auf physiologische Ionenstärke gebracht worden war.

Nach der Konzentrierung der Proteine auf 5 ml blieben diese fünf Tage in der Kälte, wobei das auskristallisierte Fc-Stück zu Boden sedimentierte. Bei 20 000 U/min wurden Sediment und Oberstand endgültig getrennt. Das Sediment wurde mehrmals in Borat-Puffer gewaschen. Der Oberstand wurde über eine Protein A-Säule geschickt, wobei nicht gespaltene Antikörper und mitgeschleppte Fc-Stücke adsorbiert wurden, während die Fab-Stücke im Durchfall erschienen.

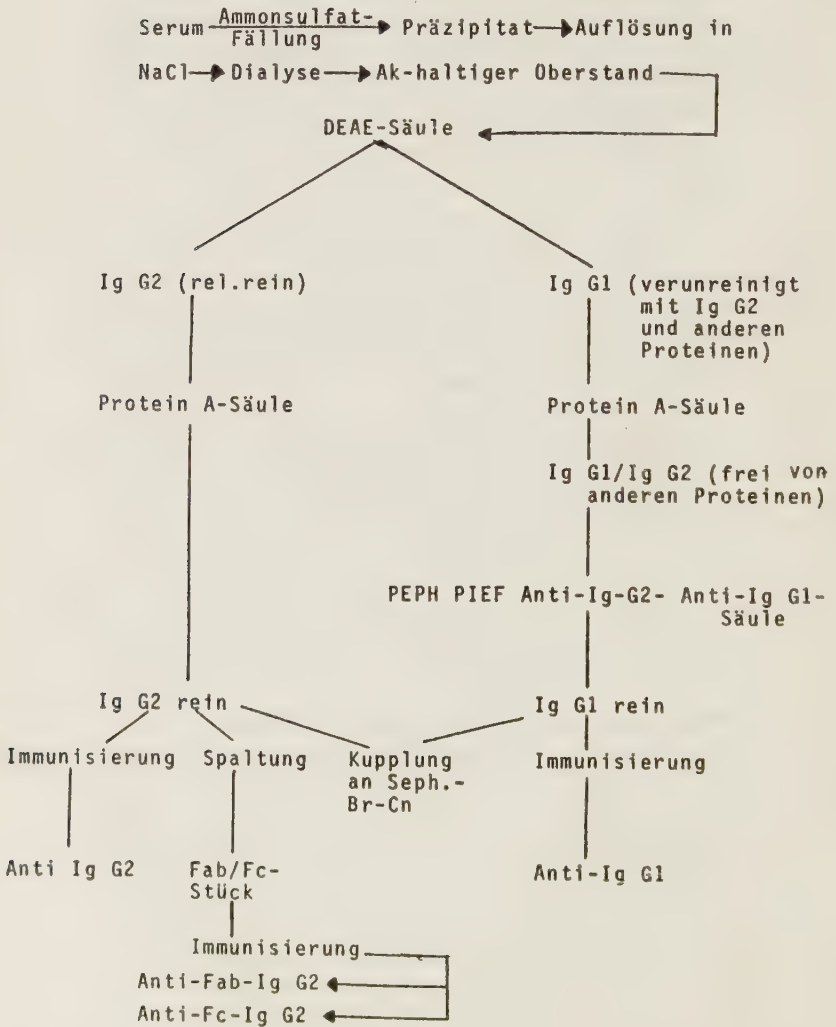
7. Herstellung von Antikörpern gegen Ig G1, Ig G2 und Spaltprodukte von Ig G2

Um gegen isolierte Antikörper sowie deren Spaltprodukte Antiseren zu erhalten, wurden sechs Hasen mit einem Mindestgewicht von 3 kg gewählt. Die zur Immunisierung verwendeten Antiseren hatten einen Proteingehalt von 1 bis 2 mg/ml 0,15 M NaCl und wurden mit komplettem Freund'schen Adjuvans den Hasen in beide Hinterpfoten sowie in den Nacken subcutan verabreicht. Nach drei Wochen erfolgte die Boosterung mit komplettem Freund'schen Adjuvans, die im Abstand von zehn Tagen wiederholt wurde. Nach weiteren zehn Tagen wurde den Hasen über die eröffnete Ohrvene Blut entnommen.

IV E R G E B N I S S E

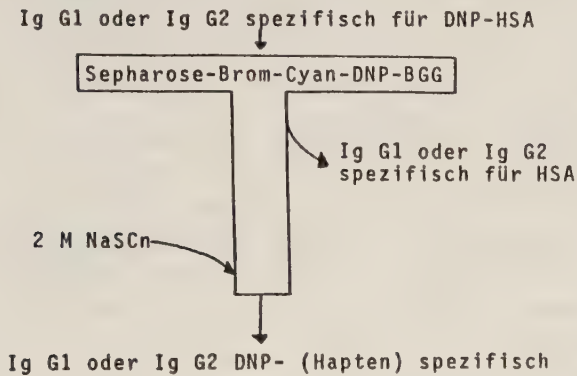
1. Die Herstellung von reinen Ig G1 und Ig G2

a) Schematischer Überblick



(Abb. 1)

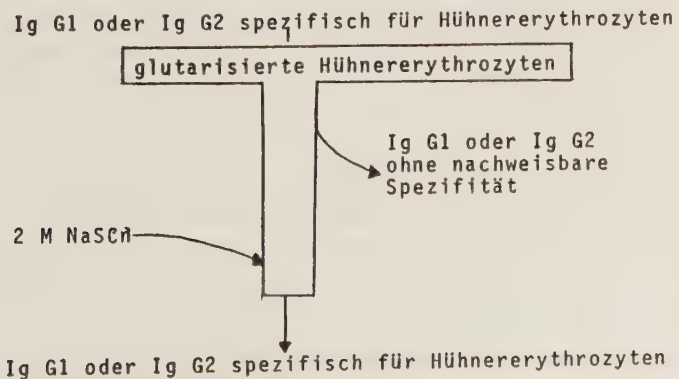
Die folgende Abb. 2 zeigt das Vorgehen bei der Gewinnung von Ig G1 und Ig G2 mit Spezifität gegen DNP.



(Abb. 2)

Die Aufarbeitung von Ig G1 oder Ig G2 spezifisch für DNP-BGG erfolgte analog unter Verwendung einer Sepharose-Brom-Cyan-Säule, an die DNP-HSA gekuppelt war.

Die Abb. 3 zeigt, wie bei der Gewinnung von Ig G1 oder Ig G2 spezifisch für Hühnererythrozyten vorgegangen wurde.



(Abb. 3)

b) Gesamtantikörperausbeute durch verschiedene
Immunisierungsverfahren

Mit den unterschiedlichen Immunisierungsver-
fahren wurden folgende Ak-Ausbeuten erzielt:

Immunisierung mit:	DNP-HSA + Adj.	DNP-BGG ohne Adj.
Immunisierungszeit:	kurz	lang
Endtiter:	1:256	1:32
Verhältnis Ig G1:2:	1:4	2:1

Immunisierung mit:	Erythrozyten + Adj.	Erythrozyten ohne Adj.
Immunisierungszeit:	kurz	lang
Endtiter:	1:64	1:16
Verhältnis Ig G1:2:	1:4	1:2

Unbehandeltes Kontroll-Meerschweinchenserum
zeigte Verhältniszahlen für Ig G1:Ig G2 wie 1:8.
Diese Werte wurden gewonnen, indem Meerschweinchen-
serum in einer arithmetischen Verdünnungsreihe im
Agargeldiffusionstest einer standardisierten Menge
eines Anti-Ig G1 oder Anti-Ig G2 ausgesetzt wurde
(vgl. S. 19). Anti-Ig G1/Ig G2 wurden hierzu so
standartisiert, daß sie eine vorgegebenen Menge
(1 mg/ml) Ig G1 bzw. Ig G2 bis zur gleichen Ver-
dünnungsstufe des Ag präzipitierten.

Die schwächere Antigenität der Hühnererythrozyten
könnte darauf zurückzuführen sein, daß sowohl
das Meerschweinchen als auch das Huhn das
heterogenetische Forssman-Antigen besitzen.

Die Verhältniszahlen von Ig G1:Ig G2 zeigen, daß
mit zunehmender Immunisierungszeit sich das Ver-
hältnis zugunsten der Ig G1 verschiebt. Die Befunde
sind mit Literaturangaben in Einklang zu bringen,

die sich auf die Serumkonzentration beziehen:

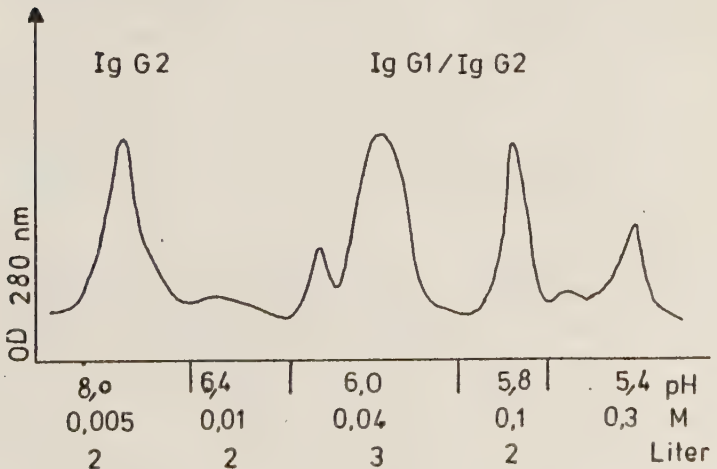
Ig G1: 0,3 - 1,0 mg/ml, Ig G2: 7 - 10 mg/ml

für unbehandeltes Kontrollserum (3). Furuichi (14) findet für Ig G2 84 % der Gesamt-Antikörper und 16 % für Ig G1.

Bei einem Immunisierungsverfahren, das dem vorliegenden sehr ähnlich ist, findet Furuichi bei kurzer Immunisierungszeit eine Gesamt-Antikörpermenge von 3,0 mg/ml mit 10 % Ig G2 und 90 % Ig G1, bei langer Immunisierungszeit eine Gesamt-Antikörpermenge von 5,3 mg/ml mit 9 % Ig G2 und 91 % Ig G1.

c) Das Ergebnis der DEAE-Säulenchromatographie

Bei der Chromatographie mit DEAE-Zellulose ergab sich ein konstantes Elutionsmuster, das in der Abb. 4 gezeigt wird.



(Abb. 4) Elution mit Puffer verschiedener Konzentration und pH-Werte (Stufenelution, nach der Methode von Oliveira et al. (40)).

Die immunoelektrophoretische Kontrolle der erhaltenen Elutionspeaks ergab, daß der Durchfallpool (pH 8,0, 0,005 M) Ig G2 ohne Verunreinigung mit Ig G1 enthielt. Er war dagegen noch kontaminiert mit elektrophoretisch weit anodisch liegenden Proteinen, die ihrer Lokalisation nach zu den Albuminen zählten und auch mit Anti-Albumin eine Präzipitationsbande ergaben.

Der bei pH 6,3 erhaltene Pool enthielt keine Ig G1 oder Ig G2.

Bei pH 6,0 und bei pH 5,8, entsprechend einer Konzentration von 0,04 M und 0,1 M wurden Ig G1 eluiert, die stets mit Ig G2 verunreinigt waren. Es gab keine Einzelfraktion, die von den kontaminierenden Ig G2 frei war. Daneben waren die bei pH 6,0 und pH 5,8 eluierten Proteine verunreinigt mit anderen weit anodisch liegenden Proteinen, die keine Ak waren. (Keine Präzipitation mit Anti-Ig G)

Bei hoher Ionenstärke, entsprechend 0,3 M, wurde ein Proteingemisch eluiert, das albuminreich, aber antikörperarm war (gemessen am Präzipitationstiter mit Anti-Albumin und Anti-Ig G).

Neben der Stufenelution wurden auch einige Präparationen mit einem Puffer mit konstantem pH aber stetig steigender Salzkonzentration in Anlehnung an Furuichi et al. (14,15) durchgeführt. (Abb. 5) Das Ergebnis dieser Chromatographie war im Hinblick auf die Reindarstellung von Ig G1 und Ig G2 mit der Stufenelution identisch, wenn auch das Elutionsmuster vom obigen (s. Abb. 4) abwich.

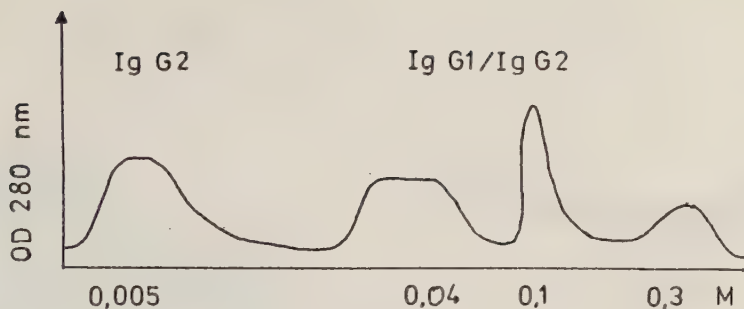


Abb. 5 Elution mit Salzgradient pH 7,5, 0,005 M/0,3 M nach Furuichi et al.

d) Reinigung mit der Protein A-Säule (vergl. Abb. 1)

Bei der nun folgenden Reinigung mit der Protein A-Säule, bei der Nicht-Antikörper-Material nicht gebunden wird und im Durchfall nach dem Auftragen erscheint, erzielt man durch spezifische Bindung und Absprengung der gebundenen Antikörper je nach Ausgangsmaterial entweder reine Ig G2 oder aber Ig G1/Ig G2-Gemische. Bei der Benutzung der Protein A-Säule trat regelmäßig ein Präzipitationstiterverlust von 25 % auf. Der Proteingehalt der Eluate plus das nicht gebundene, im Durchfall erschienene Protein stimmte mit dem Gesamtproteingehalt der Probe vor dem Auftragen überein. Der Titerverlust ist demnach allein durch verminderte Aktivität der Ak bedingt. Er könnte durch die Behandlung mit 2 M NaSCN einschließlich der erforderlichen Verdünnung, die Dialysezeit von mindestens 24 Stunden sowie die anschließende Konzentrierung in Dialyseschläuchen durch Unterdruck bedingt sein. Die Abb. 6 zeigt die Reinigung von Ig G2, ausgehend von nativem Serum.



Abb.6: Reinigung von Ig G2 aus Serum, gezeigt
in der Immunelektrophorese (oben Ig G2, unten MS,
Anode rechts. im Graben Anti-MS)

e) Reinigung mit der Anti-Ig G1-Säule

Die mit Ig G2 verunreinigten Ig G1 wurden von den an Sepharose-Brom-Cyan gebundenen Anti-Ig G1 (absorbiert mit Ig G2) vom Kaninchen spezifisch gebunden und anschließend mit 2 M NaSCN eluiert. Die so erhaltenen reinen Ig G1 waren zwar frei von Ig G2 (keine Präzipitation mit spez. Anti-Ig G2) wiesen jedoch einen spezifischen (gegen DNP-Konjugate gerichteten) Präzipitationiterverlust von 25 - 32 % auf, der nicht auf einer Verminderung der Proteinmenge beruhte. Es könnten möglicherweise die gleichen Ursachen wie bei d) vorliegen.

f) Reinigung mit der präparativen isoelektrischen Fokussierung (PIEF)

Der Vorteil der PIEF liegt in der großen Auftrags-

menge. So wurden bis zu 1,5 ml vorgereinigter Proteinlösung mit einem Proteingehalt von 15 mg/ml aufgetragen und in einem Lauf aufgetrennt. Die Auftragsmenge der verwendeten Immunabsorptionssäulen betrug dagegen nur etwa 1/20 dieser Menge. Dies lag an der geringen Menge der gekuppelten Anti-Ig G1/Ig G2 (Säulenvolumen 5 ml Gel) und der damit verbundenen geringen Adsorptionsfähigkeit für die Ak. Ein weiterer Vorteil der PIEF liegt in der kurzen Präparationszeit von nur einem Arbeitstag und der dabei stattfindenden Konzentrierung der Proteine. Der spezifische Präzipitationstiterverlust gegenüber DNP-Konjugaten variierte zwischen 10 und 15 %. Er entsprach damit einem 10 - 15 %igen Proteinverlust während der Präparation, der dadurch bedingt ist, daß das verwendete Sephadex-Gel durch Zentrifugation nicht völlig eluiert werden kann.

g) Reinigung mit der präparativen Elektrophorese (PEPH)

Der Nachteil der PEPH, deren Reinigungseffekt geringer ist als der von e) und f), liegt in einer inhomogenen Verteilung der aufgetrennten Proteine in der Agarosegelschicht. Der Wanderungsverlauf der Proteinfront ist nicht senkrecht zur Stromrichtung, sondern ähnelt einer flachen Parabel. Dieser Befund wurde erhalten, nachdem bei der Präparation der Ig G entweder Eosin oder Hammelhämoglobin mit der Probe zusammen aufgetragen worden war.

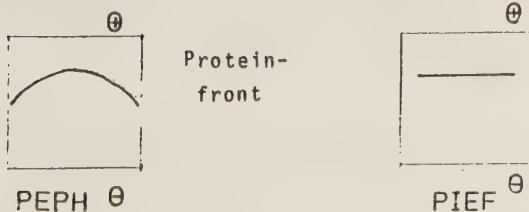


Abb. 7: Vergleich der Wanderungseigenschaften von Proteinen in Agarosegel bei der PEPH und in Sephadex G 75 Superfine bei der PIEF

Ähnliche Befunde berichten Braun und Krause(20). Sie fanden die sie interessierenden Ak in einer sechs Zentimeter breiten Zone.

Die Unterschiede in der Position der Proteinfront bei der PEPH erklären, daß nur in einem kleinen zentralen Sektor der Proteinfront reines Ig G1 zu finden ist, während in den Randzonen durch Überlappung eine geringe oder gar keine Reinigung anzutreffen ist. Die Auftragsmenge entspricht der bei der PIEF, die Ausbeute ist jedoch, gemessen am Präzipitationstiter mit Anti-Ig G1 und Anti-MS, außerordentlich gering. Das nicht kontaminierte Ig G1, gewonnen mit der PEPH, wies gegenüber dem Ausgangsmaterial einen Präzipitationstiterverlust von mehr als zehn Titerstufen auf.

h) Reinigung mit der monospezifischen Anti-Ig G2-Säule

Diese Methode nutzt das Prinzip, nicht interessierende, d. h. störende Proteine zu binden, während die gewünschten Ig G1 im Durchfall nach dem Auftragen erscheinen. Man ersparte sich damit die Behandlung der Ig G1 mit 2 M NaSCN und den damit verbundenen Titerverlust.

Der Nachteil dieser Säule lag in der begrenzten Kapazität für Ig G2. Bei dem verwendeten Säulenvolumen von 8 ml Gelvolumen lag die Bindungskapazität bei 4 mg Ig G2. Dieser Wert wurde erhalten, indem der Anti-Ig G2-Säule steigende Mengen von Ig G2 angeboten wurden, und das Eluat nach dem Auftragen auf Präzipitation mit Anti-Ig G2 untersucht wurde.

Ein weiterer Nachteil, der bei allen Immunsorptions Säulen anzutreffen ist, liegt in einem

allmählichen Nachlassen der Bindungskapazität der Säule. Dies scheint bedingt zu sein durch ein allmähliches Absprengen der gekuppelten Ak. Der Hersteller der Sepharose-Brom-Cyan-Säulen führt den allmählichen Kapazitätsrückgang auf eine verminderte Aktivität der gekuppelten Ak zurück, stellt jedoch die Lösung der gekuppelten Ak vom Sepharosegel in Abrede.

Es wurde jedoch bei der Herstellung der Immunsorptionsssäulen eine kleine Menge (1,5 mg/10 ml Gelvolumen) Hammelhämoglobin mit den Ak zusammen an Sepharose-Br-Cn gekuppelt, um optisch den Kupplungserfolg zu kontrollieren. Das ursprünglich weiße Gel war nach Beendigung des Kupplungsvorganges deutlich rosa eingefärbt.

Mit zunehmender Benutzungsdauer entfärbte sich das Gel, bis es fast wieder weiß erschien. Bei der Konzentrierung der mit NaSCn abgesprengten Proteine waren diese stets rot eingefärbt. Es muß damit geschlossen werden, daß die Entfärbung des Sepharose-Gels nicht durch eine chem. Veränderung des Häms bedingt ist, sondern auf die Absprengung des gebundenen Farbstoffes zurückzuführen ist. Für diesen Schluß spricht auch, daß bei längerer Nichtbenutzung der Säule die Färbung des Gels unverändert blieb.

Die Abb. 8 zeigt als Endprodukt der Reinigung Ig G1, das aus nativem Serum durch Chromatographie an einer DEAE- und an der Protein A-Säule sowie durch die PIEF gewonnen wurde.

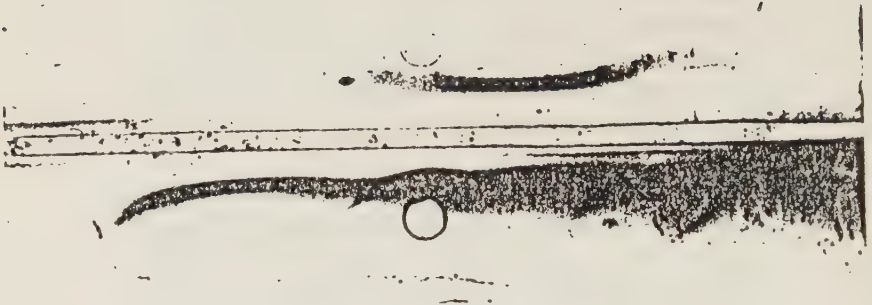


Abb. 8 Reinigung von Ig G1, ausgehend von
Serum, gezeigt in der Immunelektrophorese
(oben Ig G1, unten MS, im Graben Anti-MS)
Die Anode befindet sich rechts

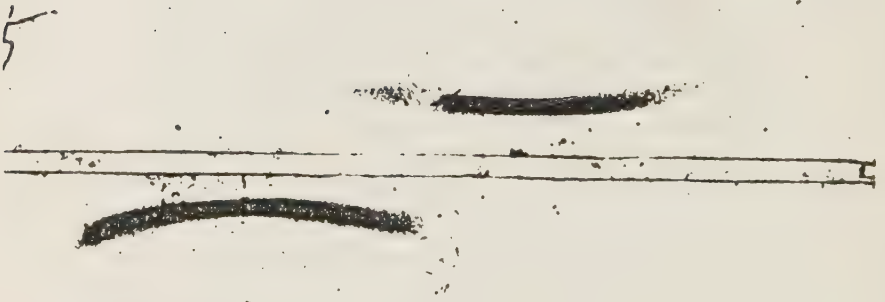


Abb. 9 Vergleich von Ig G1 und Ig G2 in der
Immunelektrophorese. (Oben Ig G1,
unten Ig G2, im Graben Anti-MS)
Die Anode befindet sich rechts

i) Vergleich der Methoden zur Herstellung reiner Ig G1

Im folgenden sollen die verschiedenen Verfahren hinsichtlich ihrer Ausbeute und ihres Reinigungseffektes in bezug auf Ig G1 verglichen werden. Weiterhin sollen der zeitliche Aufwand für die Präparation und der entstandene Titerverlust verglichen werden.

Einen Überblick gibt die Tabelle auf der nächsten Seite.

Die gewonnene Menge wurde quantifiziert, indem das Ausgangsmaterial durch Immunpräzipitation mit Anti-Ig G1 ausstitriert wurde (vgl. Seite 19). Ein Eluat, das immunoelektrophoretisch reine Ig G1 enthielt, wurde auf das Ausgangsvolumen konzentriert und erneut mittels Immunpräzipitation titriert. Als sehr hoch wurden Präzipitationstiter bezeichnet, die 80 % und mehr des Ausgangstiters waren. Titer, die zwischen 50 und 80 % des Ausgangstiters lagen, führten zur Bezeichnung "hoch". Titer zwischen 25 und 50 % zur Bezeichnung "mittel". Für Titer unter 25 % wurde die Bezeichnung "gering" gewählt.

Die Quantifizierung des Titerverlustes erfolgte durch spezifische Immunpräzipitation von DNP-Konjugaten. Es wurde einer konstanten Menge DNP-Konjugat (10 μ l DNP-Konjugat-Lösung, die 1 mg Protein/ml enthielt) zunächst in einer arithmetischen Reihe steigende Verdünnungen der zu reinigenden Ausgangsproben im Agargelddiffusionstest angeboten. Eine nach Färbung des Gels sichtbare Präzipitationsbande wurde als positiv gewertet. Der so erhaltene Titer der Probe wurde verglichen

Methode	Ausbeute	Dauer	Titerverlust	Reinigungseffekt
Anti-Ig G1-Säule	+	3 Tage	++++	+++
PIEF	++++	1 Tag	+	++++
PEPH	++/+	2 Tage	+	+
Anti-Ig G2-Säule	++++	1,5 Tage	++/+++	++++

++++ sehr hoch +++ hoch ++ mittel + gering

Tabelle 1

mit dem Präzipitationstiter, den man bei gleicher Versuchsanordnung erhielt, nachdem die Probe in den angeführten Verfahren aufgetrennt worden war, und die proteinhaltigen Pools wieder miteinander vermischt worden waren, und die Ausgangskonzentration wieder erreicht war. Ein sehr hoher Titerverlust lag vor, wenn er mehr als acht Titerstufen betrug (z.B. Ausgangstiter 1:2048, Titer nach der Reinigung 1:4). Als hoch wurde der Titerverlust bezeichnet, wenn er mehr als sechs Titerstufen betrug, als mittel, wenn er mehr als 3 Titerstufen betrug und als gering, wenn er weniger als 3 Titerstufen betrug.

Die Reinheit der erhaltenen Proteine wurde durch den Agardiffusionstest und in der Immunelektrophorese mit monospezifischen Anti-Ig G1- und monospezifischen Anti-Ig G2- Immunsereen sowie durch Anti-MS geprüft. Ein sehr hoher Reinigungseffekt lag vor, wenn die erhaltenen Ig G1 nur noch mit Anti-Ig G1 eine Präzipitationsbande ergaben, mit Anti-Ig G2 jedoch keine Reaktion mehr zeigten und in der Immunelektrophorese mit Anti-MS nur noch eine an der für Ig G1 typischen Lage Präzipitationsbande zeigten.

Als hoch wurde der Reinigungseffekt bewertet, wenn die eben geschilderten Befunde nur nach Verdünnung auf wenigstens 1:2 erhalten wurden. Ein geringer Reinigungseffekt lag vor, wenn die erhaltenen Proteine in der Immunelektrophorese entweder mehrere Banden zeigten, oder im Agardiffusionstest mit Anti-Ig G2 präzipitierten.

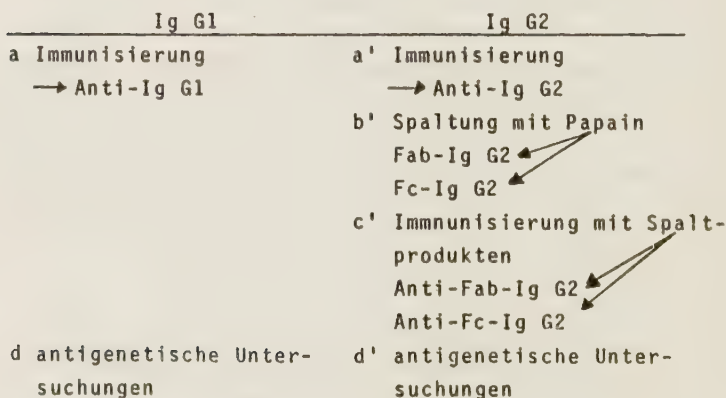
Als optimale Methode zur Gewinnung von reinem Ig G1 hat sich die PIEF herauskristallisiert. Die theoretisch ideale Reinigung mit der Anti-Ig G2-Säule enttäuschte in der Praxis wegen eines relativ hohen Titerverlustes (Titerverlust von 3-5 Stufen, vgl. oben). Als Ursache kommt ein Proteinverlust in Frage, der dadurch entstand, daß mit

dem Spülpuffer nach dem Auftragen der Probe auf die Immunabsorptionssäule nicht alle Ig G1 ausgespült worden. Wurde mit 0,5 M NaCl gespült, um unspezifisch gebundenes „Ak-Material“ abzulösen, so konnte mit Anti-Ig G1 Ig G1 nachgewiesen werden. Diese so eluierten Ig G1 waren jedoch wertlos, da sie nach der Dialyse gegen einen physiologischen Puffer keine Aktivität mehr zeigten, aber für antigenetische Untersuchungen noch brauchbar waren. Die Anti-Ig G1-Säule kann zur Herstellung von Immunisierungsmaterial herangezogen werden oder zur Erzeugung von Material für antigenetische Untersuchungen, d.h. für Versuche, bei denen eine Ak-Aktivität der Proteine nicht erforderlich ist.

Die PEPH ist wegen der bereits oben aufgeführten Unzulänglichkeiten abzulehnen.

2. Die weitere Behandlung der reinen Ig G1 und Ig G2

Mit den gewonnen immunoelektrophoretisch reinen Ig G1 und Ig G2 wurden weitere Versuche durchgeführt, über die das folgende Schema informiert.



Eine Spaltung der Ig G1 zur Gewinnung von Fab-Ig G1 und Fc-Ig G1 wurde nicht durchgeführt, weil die pro Spaltung benötigte Menge an reinem Ig G1 75 - 100 mg beträgt (38). Die pro Reinigungslauf erbeutete Menge an reinem Ig G1 lag jedoch nur bei 4-6 mg. Davon wurden meist 50 % zur Immunisierung und für antigentische Untersuchungen verbraucht.

Die Anhäufung von Ig G1 konnte einerseits aus zeitlichen Gründen nicht realisiert werden, zum anderen war das Blockieren des Arbeitsmaterials für längere Zeit aus labortechnischen Gründen nicht möglich.

Probeweise wurden mit Ig G2 Spaltversuche mit einer geringeren Menge an Ausgangsmaterial durchgeführt. Es gelang jedoch nicht, das sedimentierte Fc-Kristall zu gewinnen. Der Versuch, diese Mikromethode zu verfeinern, wurde aus zeitlichen Gründen nicht gemacht.

Zu a und a': Gegen die immunelektrophoretisch reinen Ig G1 und Ig G2 (vgl. Abb. 9) erzeugten je zwei ca. sechs Pfund schwere Kaninchen hochtitrige Antiseren, die als Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2 bezeichnet wurden. (Anti-Ig G1-Titer: 1:1024, Anti-Ig G2-Titer 1:2048)

Das Anti-Ig G1 präzipitierte jedoch nicht nur Ig G1, sondern auch Ig G2. Das Anti-Ig G2 verhielt sich entsprechend. Die Abb. 10a und 10b zeigen das Verhalten von Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2.

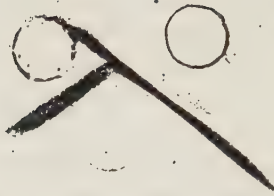


Abb. 10a: Agargeldiffusion von Anti-Ig G1 (unten)
gegen Ig G1 (oben rechts) und Ig G2
(oben links)

Die Präzipitationslinie gegen Ig G2 zeigte hier, wie auch in anderen, noch folgenden Abbildungen, eine Doppelkonturierung. Bei dieser doppelten Präzipitationsbande kann es sich um die Erfassung von Subklassen des Ig G2 handeln, bzw. um die Erfassung von elektrophoretisch gleich wandernden Proteinen, da sich die Doppelbande bei einer immunoelektrophoretischen Kontrolle dieser Probe nicht zeigte. Der Versuch, eine der beiden Banden durch Adsorption an monospezifischem Anti Ig G2 zu eliminieren, mißlang: Der Pool des nicht adsorbierten Proteins nach dem Auftragen auf die Säule enthielt kein immunologisch-nachweisbares Ig G2 mehr, der mit NaSCN erhaltene Pool zeigte die gleiche Doppelbande wie das Ausgangsmaterial. Auch Adsorptionsversuche an Anti-Ig G1 oder Protein A konnten die Doppelbande nicht zum Verschwinden bringen.



Abb. 10b: Agargeldiffusion von Anti-Ig G2 (unten links) gegen Ig G1 (unten rechts) und Ig G2 (oben)

Die Präzipitationsbanden spornten im Sinne der Teilidentität. Anti-Ig G1 erfasst mehr Determinanten von Ig G1 als von Ig G2, Anti-Ig G2 verhält sich umgekehrt. Die Kreuzreaktion erfolgte erwartungsgemäß, da, wie in der Einleitung ausgeführt, Ig G1 und Ig G2 sowohl über identische als auch über verschiedene Determinanten verfügen. Zum Phänomen der Doppelbande von Anti-Ig G2 gegen Ig G1 siehe Abb. 10a.

Um Ak zu erhalten, die nur mit Ig G1 oder nur mit Ig G2 reagieren, wurden die Anti-Ig G1 und die Anti-Ig G2 depletiert. Dazu wurden Ig G1 und Ig G2 an Sepharose-Br-Cn gekuppelt, und je eine kleine Säule mit einem Gelvolumen von 5 ml hergestellt. Die Kaninchen-Antiseren wurden, wenn sie mit Ig G1 als Ag hergestellt worden waren, an Sepharose-Br-Cn-Ig G2 depletiert. War das Ag jedoch Ig G2, erfolgte die Depletion mit Sepharose-Br-Cn-Ig G1.

Die depletierten Seren stellten "monospezifisches Anti-Ig G1" und "monospezifisches Anti-Ig G2" dar. Die Monospezifität wurde im Agargeldiffusionstest und in der Immunelektrophorese kontrolliert. (Siehe Abb. 11 und Abb. 12)



Abb.11: Agargeldiffusionstest von Ig G1 und Ig G2 unter Verwendung "monospezifischer Immunsere"

linke Hälfte: Ig G1 (oben links), Ig G2 (oben rechts) und "monospez. Anti-Ig G1" (unten)

rechte Hälfte: Ig G2 (oben links), Ig G1 (oben rechts) und "monospez. Anti-Ig G2" (unten)

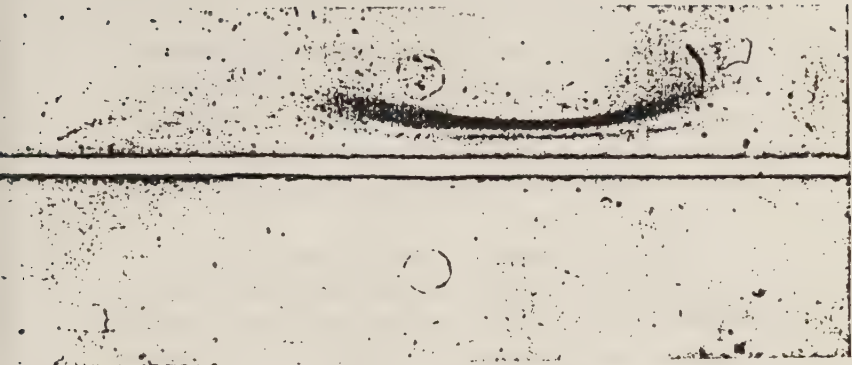


Abb. 12: Immunelektrophorese von Ig G1 und Ig G2
unter Verwendung von "monospezifischem
Anti-Ig G1"

Ig G1 oben, Ig G2 unten, im Graben "mono-
spezifisches Anti-Ig G1". Die Anode befin-
det sich rechts.

Die schwach ausgeprägte Doppelbande dürfte auf Dif-
fusionsphänomenen beruhen (16).

Zu b': Spaltung von Ig G2 mit Papain

Die Spaltung erfolgte wie bereits auf Seite 28 be-
schrieben. Nach Beendigung der Spaltung erfolgte
eine Sedimentationsphase von fünf Tagen bei 4° C.
Am Boden des Zentrifugenglases befand sich ein
kristallähnliches Sediment, das die Fc-Stücke ent-
hielt. Der wasserklare Oberstand enthielt die
Fab-Stücke, ungespaltenes Ig G2 sowie nicht sedi-
mentiertes Fc-Ig G2. Um aus dem Oberstand die
Fab-Stücke zu erhalten, wurde dieser über eine Pro-
tein A-Säule geschickt, von der bekannt ist, daß
sie alle Fc-haltigen Kontaminanten absorbiert. Der
nach dem Auftragen erhaltene Pool wurde konzen-
triert.

Die Fc-Kristalle wurden mit verschiedenen Methoden

behandelt, um sie wieder in Lösung zu bringen. Es wurden verschieden stark konzentrierte Salzlösungen (0,05 M bis 0,4 M), pH-Verschiebungen zwischen pH 4,5 und pH 11 sowie Erwärmung und Inkubation im 37° C Wasserbad angewandt. Auch die Anwendung von konzentrierter Urea, Guanidin sowie die Kombination der verschiedenen Maßnahmen war nicht geeignet, die Fc-Stücke wider vollständig in Lösung zu bringen.

Zu c': Immunisierung mit Spaltprodukten

Die Fab-Ig G2 und die Fc-Ig G2 wurden je zwei ca. sechs Pfund schweren Kaninchen injiziert, die gegen diese Ag Ak erzeugten. Der Titer des Anti-Fab-Serums war nach dreimaliger Injektion 1:512 und stieg im Laufe von neun Monaten nach je vierzehntägiger Boosterung auf 1:4096. Der Titer des Anti-Fc-Serums betrug nach dreimaliger Injektion 1:64 und stieg im gleichen Zeitraum wie oben nur auf 1:128. Möglicherweise liegt die Ursache für die Diskrepanz der Titer in der geringeren Löslichkeit des Fc-Ig G2, das dadurch am Ort der Injektion unresorbiert liegen blieb. Die Tiere entwickelten an der Injektionsstelle doppelt so große Granulome wie die Kaninchen, die Fab-Ig G2 als Ag injiziert bekamen.

Zu d und d': Antigenantisches Verhalten

Um das Determinantenmuster der Ig G1 und der Ig G2 sowie deren Spaltprodukte zu untersuchen, wurden diese in verschiedenen Anordnungen mit den erzeugten Antiseren kombiniert. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über das Determinantenmuster. Die Besprechung der in der Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse erfolgt anschließend unter Dokumentation anhand der Agargeldiffusionstests.

Immunserum	Präzipitation mit			
	Ig G2	Ig G1	Fab-Ig G2	Fc-Ig G2
Anti-Ig G2	+	+	+	+
Monospezifisches Anti-Ig G2	+	Ø	Ø	+
Anti-Ig G1	+	+	+	Ø
Monospezifisches Anti-Ig G1	Ø	+	Ø	Ø,
Anti-Fc-Ig G2	+	+	Ø	+
Anti-Fab-Ig G2	+	+	+	Ø/(+)

Tab. 2: Übersicht über das Präzipitationsverhalten von Ig G1, Ig G2, Fab-Ig G2 und Fc-Ig G2 mit verschiedenen Antiseren

Anti-Ig G2 zeigt neben seiner bereits auf Seite
beschriebenen Präzipitation mit Ig G1 und Ig G2
auch eine Präzipitation von Fab-Ig G2 und Fc-Ig G2.
Siehe Abb.13a, 13b, 13c.

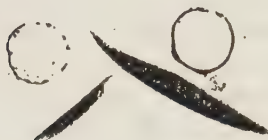


Abb. 13a: Präzipitation von Ig G2 (oben rechts)
und Fab-Ig G2 (oben links) durch Anti-
Ig G2 (unten in der Mitte)

Die Präzipitationsbande von Fab-Ig G2 erscheint
in dieser Kombination als Doppelbande. Die immu-
nelektrophoretische Kontrolle mit Anti-Fab-Ig G2 sowie
mit Anti-MS ergab aber nur eine Präzipitationsbande.
Wurde die Konzentration des Fab-Ig G2 aber verringert,
so stellte sich nur noch eine scharfe Bande dar.
Bei dem Versuch, eine der beiden Banden durch Ab-
sorption an Anti-Fab-Ig G2 zum Verschwinden zu
bringen, verschwanden entweder beide Banden
(Durchfall-Elution nach dem Auftragen auf die
Anti-Fab-Ig G2-Säule) oder sie erschienen gemeinsam
nach der Elution mit NaSCN.

Die Abb.13a zeigt die Teilidentität des Fab-Ig G2
mit dem Ig G2, die sich, wie es sich theoretisch

voraussagen ließ, in einer Spornung von Ig G2 über Fab-Ig G2 ausdrückte.



Abb. 13b: Präzipitation von Fab-Ig G2 (oben rechts) und Fc-Ig G2 (oben links) mit Anti-Ig G2 (unten in der Mitte)

Es zeigt sich eine Kreuzung der Präzipitationsbanden, die auf distincte antigenische Determinanten von Fab-Ig G2 und Fc-Ig G2 hinweist.



Abb. 13c: Präzipitation von Ig G2 (oben links) und Fc-Ig G2 (oben rechts) mit Anti-Ig G2 (unten in der Mitte)

Entsprechend der Abb. 13a zeigt sich eine Spornung der Präzipitationslinien von Ig G2 über Fc-Ig G2, die auf eine Teilidentität der verwendeten Ag hinweist.

Das absorbierte und als "monospezifisches-Anti-Ig G2" bezeichnete Antiserum unterschied sich vom unbehandelten Anti-Ig G2 dadurch, daß es keine Reaktion mehr mit Ig G1 zeigte und auch nicht mehr mit Fab-Ig G2 präzipitierte.

Das Verhalten von Anti-Ig G1 zeigt, soweit es nicht bereits in der Abb. 10a dargestellt wurde, die Abb. 14.



Abb. 14: Präzipitation von Fab-Ig G2 (oben links) und Ig G1 (oben rechts) mit Anti-Ig G1 (unten in der Mitte).

Es zeigt sich eine Spornung der Präzipitationsbande von Ig G1 über Fab-Ig G2 mit Anti-Ig G1. Dieser Befund korreliert mit dem bereits auf Seite beschriebenen Präzipitationsverhalten von Anti-Ig G1, das neben Ig G1 auch Ig G2 präzipiziert.

Dieses Verhalten ist, wie bereits in der Einleitung ausgeführt, auf die identischen Fab-Anteile von Ig G1 und Ig G2 zurückzuführen. Neben den Fab-Determinanten erfasst Anti-Ig G1 aber auch noch die Ig G1-exklusiven Determinanten, so, daß daraus die Spornung resultiert.

Das an Sepharose-Br-Cn-Ig G2 depletierte und als "monospezifisches Anti-Ig G1" bezeichnete Serum zeigt erwartungsgemäß nur noch eine Reaktion mit Ig G1.

Die folgende Abb. 15a, 15b und 15c verdeutlicht die Reaktion des gegen Fc-Ig G2 gerichteten Antiserums.



Abb. 15a: Präzipitation von Fc-Ig G2 (oben rechts) und Ig G2 (oben links) mit Anti-Fc-Ig G2 (unten in der Mitte)

Die Abb. zeigt die erwartete ungespornte und ungekreuzte Präzipitationsbande, da von Ig G2 nur der Fc-Anteil erfaßt wird.

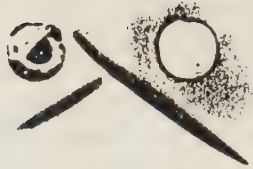


Abb. 15b: Präzipitation von Ig G1 (unten in der Mitte) durch Anti-Fc-Ig G2 (oben links) und durch "monospezifisches Anti-Ig G1 (oben rechts)

Die Abb. 15b zeigt die überraschende Präzipitation von Ig G1 durch Anti-Fc-Ig G2 und den Vergleich von monospezifischem Anti-Ig G1 mit Anti-Fc-Ig G2. Monospezifisches Anti-Ig G1 erfaßt eine größere Anzahl von Determinanten des Ig G1-Moleküls als Anti-Fc-Ig G2, so daß eine Spornung entsteht. Das monospezifische Anti-Ig G1 wurde, wie oben beschrieben, durch Absorption an Ig G2 gewonnen. Um das Verhalten des Anti-Fc-Ig G2 näher zu untersuchen, wurde eine kleine Probe des Antiserums an Gesamt-Ig G1 absorbiert.

Das nicht an Sepharose-Br-Cn-Ig G1 gebundene Anti-Fc-Ig G2 zeigte keine Reaktion mehr mit Ig G1, wohl aber noch mit Ig G2 und Fc-Ig G2. Es entsprach in seiner Reaktionsweise völlig dem als "monospezifisches Anti-Ig G2" bezeichneten Antiserum.

Das mit NaSCN eluierte Anti-Fc-Ig G2 zeigte wieder die Reaktion mit Ig G1 und Ig G2.



Abb. 15c: Präzipitation von Ig G1 (unten rechts) durch Anti-Fc-Ig G2 (in der Mitte oben) und Anti-Ig G1, das nicht absorbiert wurde (unten links)

Die Abb. 15c vergleicht nicht absorbiertes Anti-Ig G1 und Anti-Fc-Ig G2 bei der Präzipitation von Ig G1. Wie bei der Abb. 15b zeigt Anti-Fc-Ig G2 die Erfassung von weniger Determinanten des Ig G1 als Anti-Ig G1. Hieraus resultiert die Spornung der Präzipitationsbanden.

Das Verhalten des Anti-Fab-Ig G2 zeigt die Abb. 16.



Abb. 16a: Präzipitation von Ig G2 (bei 12 Uhr), Fab-Ig G2 (bei 14 Uhr) und Ig G1 (bei 16 Uhr) durch Anti-Fab-Ig G2 (zentral)

Die Abb. 16 a zeigt neben der dicken Hauptbande noch drei Nebenbanden. Bei den beiden um das Zentrum angeordneten schwachen Präzipitationsbanden dürfte es sich um Diffusionseffekte handeln. (16)

Peripher der Hauptbande erscheint eine weitere, die kürzer ist und nur bei 12 Uhr und 14 Uhr nachweisbar wird.

Es könnte sich dabei um die Erfassung von Kappa-lambda-Determinanten handeln oder um Ig G2-typische Determinanten, da sich die Präzipitation nur bei Ig G2 und Fab-Ig G2 zeigt, nicht jedoch bei Ig G1.

Wurde die Konzentration von Ig G2, Fab-Ig G2 und Ig G1 verringert, so verschwand die periphere Bande.

Die Abb. 16a zeigt die theoretisch voraussagbare Identität zwischen Fab-Ig G2 und Ig G2 sowie die Identität von Fab-Ig G2 und Ig G1 bei Verwendung von Anti-Fab-Ig G2.

Die folgende Abb. 16b zeigt die Präzipitation von Ig G1 und Ig G2 durch Anti-Fab-Ig G2. Es zeigt sich eine einheitliche Präzipitationsbande zwischen Ig G1 und Ig G2. Die immunologische Gleichheit dürfte ihre Ursache im gleichen Determinantenmuster des Fab-Teils von Ig G1 und Ig G2 haben, das durch die isotypischen Determinanten kappa und lamda der leichten Kette bedingt ist und weiter oben bereits erwähnt wurde.



Abb. 16b: Präzipitation von Ig G1 (oben links) und Ig G2 (oben rechts) durch Anti-Fab-Ig G2 (unten in der Mitte).

Das Anti-Fab-Ig G2 zeigte auch gegen Fc-Ig G2 eine Reaktion, die sich jedoch nicht in einer scharfen Präzipitationsbande ausdrückte, sondern wölkchenartig nahe dem Einfülloch für Fc-Ig G2 zu finden war, wenn Ag und Ak unverdünnt eingesetzt wurden. Beim Versuch, durch Konzentrationsänderung die Äquivalenzzone für Ag und Ak zu finden, verschwand der Präzipitations-schatten stets.

Es liegt die Vermutung nahe, daß das verwendete Fc-Stück Fab oder Spaltprodukte von Fab mitschleppte, die sich durch mehrmaliges Waschen nicht entfernen ließen.

Um die Gleichheit des Fab-Abschnitts von Ig G1 und Ig G2 zu verifizieren, wurde Anti-Fab-Ig G2 über eine Sepharose-Br-Cn-Ig G1-Säule geschickt. Die Chromatographie erfolgte in der oben bereits beschriebenen Weise. Der Durchfall nach dem Probenauftrag enthielt keine präzipitierenden Ak mehr. Das mit NaSCN abgelöste Protein zeigte nach der Konzentrierung außer einem erheblichen Titerverlust die gleichen Reaktionen wie das unbehandelte Anti-Fab-Ig G2. Ein Reinigungseffekt zeigte sich insofern, als nach der Chromatographie die schwache, wolkige Reaktion mit dem Fc.IgG2 ausblieb.

V D I S K U S S I O N

Es hat sich gezeigt, daß die Gewinnung von reinen Ig G1 und Ig G2 mit den in der Literatur angegebenen Verfahren (14,31,50,53) hier nicht möglich war. Die Ursachen dafür können nur vermutet werden: es könnte sich um methodisch-technische Differenzen wie Unterschiede der verwendeten Reagenzien und Geräte handeln, oder um Differenzen, die in der Auswahl der Versuchstiere und deren Haltung liegen.

Die Tatsache, daß Osler und Oliveira (40) die DEAE-Stufenelution mit steigender Salzkonzentration und fallendem pH wählten, Furuichi und Koyoma (15) einen Salzkonzentrationsgradienten bei gleichbleibendem pH empfehlen und Vuagnat (50) einer DEAE-Ionenaustauscherchromatographie die Immunabsorption mit Anti-Ig G1 bzw. Anti-Ig G2 folgen ließ zeigt, daß keine allgemein anerkannte Standardpräparation existiert, die überall mit Erfolg angewandt werden kann.

Es mag sein, daß die erwähnten Verfahren zur Herstellung von Ig G1 und Ig G2 für funktionelle Untersuchungen ausreichend sind, für antigenetische Untersuchungen haben sie sich als unbrauchbar erwiesen.

Nachfolgend sollen noch einmal die in der Literatur angegebenen Verfahren tabellarisch aufgeführt werden.

Autor	Methode	Technik
Osler und Oliveira	DEAE-Ionenaustauscher	stufenweise Steigerung der Salzkonzentration, stufenweise fallendes pH Salzkonz.: 0,005 M, 0,01 M, 0,05 M 0,1 M, 0,3 M pH: 8,0, 6,3, 6,0, 5,8, 5,4
Furuichi und Koy- oma	DEAE-Ionenaustauscher	monoton steigende Salzkonzentration gleichbleibendes pH Salzkonz.: 0,005 M bis 0,3 M pH: gleichbleibend 7,5
Vuagnant	I DEAE-Ionenaustauscher II Immunabsorption	Technik von Osler und Oliveira Immunabsorption mit Anti-Ig G2 zur Erzeugung reiner Ig G1 und Anti-Ig G1 zur Erzeugung reiner Ig G2

Tabelle 3

Ausgehend von der Methode nach Osler und Oliveira wurde zunächst die DEAE-Ionenaustauscherchromatographie erprobt, mit der aber die angegebenen Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten. Es wurden deshalb neue Verfahren erprobt, zum Teil in Kombination miteinander, die nun noch einmal aufgelistet werden sollen:

Methode	Technik
PIEF	Trennung amphoterer Substanzen, also Proteine und Peptide, aufgrund ihres Isoelektrischen Punktes (IP) im Sephadex-Gel G 75 Superfine
PEPH	Auftrennung eines Proteingemisches durch Wanderung im elektrischen Feld (10 V/cm) in 1%igem Agarosegel
Protein A	Bindung von Fc-haltigen Eiweißen verschiedener Spezies (4g) an Protein A und anschließendes Absprengen mit 2 M NaSCN
Immunabsorption	Fixierung von Ig G1 oder Ig G2 an Anti-Ig G1 oder Anti-Ig G2 und anschließendes Absprengen mit 2 M NaSCN

Am brauchbarsten hat sich hier die PIEF erwiesen, sowohl in Kombination mit anderen Verfahren, als auch alleine. Bei geringem Zeitaufwand liefert sie reine Ig G1 in ausreichender Menge bei geringem Titerverlust.

Die Anwendung der PEPH kann nicht empfohlen werden, da durch einen inhomogenen Stromfluß die Auftrennung der zu reinigenden Ak sehr gering ist. Dadurch kommt es zu einer geringen Ausbeute bei schlechter Reinigung. Die erforderliche Elution der Proteine aus dem Agarosegel ist sehr zeitaufwendig. Eine Verbesserung der Methode scheint möglich durch die Verwendung einer

den Stromfluß begünstigenden Substanz. Hierzu bietet sich Pevikon an. Es müsste überprüft werden, ob die Auftrennung der Ig G1 und Ig G2 in der Pevikon-Block-Elektrophorese bessere Ergebnisse erbringt.

Die Protein A-Säule ist zur Trennung von Ig G1 von Ig G2 ungeeignet, da sie Ig G1 und Ig G2 in gleicher Weise bindet.(49). Sie kann zur Abtrennung von Nicht-Ak-Material verwandt werden, hat aber den Nachteil, die Ak in ihrer Aktivität um ca. 30% zu mindern.

Die Benutzung der Anti-Ig G2-Immunabsorptions-säule hat in praxi den Nachteil einer zu geringen Kapazität und eines allmählichen Nachlassens der Adsorptionsfähigkeit durch Absprengung der gekuppelten Ak.

Die Beeinflussung der Produktion von Ig G1 und Ig G2 durch die Art der Immunisierung:

Die in der Literatur beschriebenen Immunisierungsverfahren sollen noch einmal tabellarisch vorgestellt werden.

Autor Produktion von vornehmlich Ig G1 von vornehmlich Ig G2

Nussenzweig (35)	lange Immunisierungszeit, kein Adjuvans, Lösung des Ag in phys. NaCl, Ag: DNP-BGG	kurze Immunisierungszeit, kompl. Freund'sches Adjuvans Ag: DNP-HSA
Oliveira und Sandberg (39)	1 mg Ag initial, 3 x Boostern mit 60 μ g Ag, Töten der Tiere 14 Tage nach der letzten Boosterung Initialinjektion und Boosterung in die vier Fußballen	1 mg Ag initial, 2 x Boostern mit 60 μ g , Töten der Tiere 8 Tage nach der letzten Booster- ung
Furuichi und Koyoma (15)	Ag-Dosis 0,1 bis 3,0 mg in kompl. Freund'schen Adjuvans, 2 bis 3 x Boostern mit der glei- chen Dosis, Töten der Tiere 8-14 Tage nach der letzten Boosterung Initialinjektion und Boosterung in die Peritonealhöhle	Ag-Dosis 0,001 bis 0,01 mg in kompl Adjuvans, 2 bis 3 x Boostern mit der gleichen Dosis, Töten der Tiere 8-14 Tage nach der letzten Boosterung

Tabelle 4

Für die vorliegende Arbeit wurden die Ergebnisse von Nussenzweig und Oliveira/Sandberg zu einem Immunisierungsschema vereint, das nachstehend noch einmal aufgeführt ist.

Sollte möglichst viel Ig G2 erhalten werden, bekamen die Meerschweinchen 1 mg DNP-HSA in kompl. Freund'schen Adjuvans in die vier Pfoten injiziert. Es folgte 2 x Boostern und Töten der Tiere 8 Tage nach der letzten Boosterung

Wenn das Schwergewicht auf die Produktion von Ig G1 gelegt wurde, bekamen die Versuchstiere 1 mg DNP-BGG in physiologischer Kochsalzlösung in die vier Fußballen injiziert. Einer dreimaligen Boosterung mit 60 μ g Ag folgte das Töten der Tiere 14 Tage nach der letzten Injektion.

Die Ergebnisse von Furuichi/Koyoma waren noch nicht veröffentlicht zum Zeitpunkt der Immunisierung.

Der niedrige Gesamttiter der hier erhaltenen Immunseren wird nach den ergebnissen von Furuichi und Koyoma dadurch erklärlich, daß die Tiere hier mit einer Ag-Dosis immunisiert wurden, die geeignet ist, die Ig G2-Produktion zugunsten der Ig G1-Produktion zu unterdrücken. Sie fanden bei entsprechender Ag-Dosis eine Verminderung der Ig G2-Produktion auf Werte zwischen 10% und 50% der Gesamtantikörperproduktion.

Andererseits musste infolge der kurzen Immunisierungszeit eine hohe Ausbeute an Ig G1 deswegen unterbleiben, weil die Tiere geschlachtet wurden, bevor das Maximum der Ig G1-Produktion erreicht war.

Die von Nussenzweig betonte Natur des Ag spielt offensichtlich keine so bedeutende Rolle, da Furuichi und

Koyoma die Bevorzugung der Ig G1- oder der Ig G2-Produktion allein dosisabhängig fanden.

Der niedrige Endtiter der Immunseren, die im Hinblick auf eine hohe Ig G1-Ausbeute erzeugt worden waren, liegt möglicherweise am Fehlen des Freund'schen Adjuvans.

Die Ergebnisse der antigenetischen Untersuchungen sollen zunächst noch einmal zusammengestellt werden und anschließend mit den Angaben der Literatur verglichen werden.

Die in der Elektrophorese als distincte Proteine nachgewiesenen Immunglobuline Ig G1 und Ig G2 (siehe Abb. 6 und Abb. 8) sind antigenetisch nicht völlig verschieden. Dies beweist die Tatsache, daß Anti-Ig G1, das nach Immunisierung mit Ig G1 erzeugt worden war, und Anti-Ig G2, das nach Immunisierung mit Ig G2 erzeugt worden war, nicht nur das zu zur Induktion benutzte Ag präzipitierten, sondern auch das nicht zur Induktion benutzte. Dies wurde in der Abb. 10 a und 10 b gezeigt.

Die mit beiden Immunglobulintypen reagierenden Ak lassen sich durch Absorption entfernen, wie in der Abb. 11 gezeigt wurde. Wurde ein solches, durch Absorption gewonnenes Antiserum, das nur noch mit Ig G1 oder Ig G2 reagierte, mit Fab-Ig G2 im Agargel-diffusionstest in seinem Verhalten beobachtet, so konnte weder das monospezifische Anti-Ig G1, noch das monospezifische Anti-Ig G2 mit Fab-Ig G2 ein Präzipitat bilden.

Dagegen zeigte das monospezifische Anti-Ig G2 noch eine Präzipitationsbande mit Fc-Ig G2, während das

monospezifische Anti-Ig G1 keine Reaktion mit Fc-Ig G2 zeigte.

Es muß daher geschlossen werden, daß die distincten antigenetischen Determinanten auf dem Fc-Teil des Ak zu finden sind, während die Fab-Teile als identisch gelten müssen. Dieser Schluß wird noch erhärtet durch das Phänomen der Doppelbande, das bereits auf Seite 58 angesprochen wurde. Auch wenn die Ursache des Doppelbandenphänomens ungeklärt geblieben ist, so zeigt sich doch, daß diese Phänomen nur bei Verwendung nicht absorbierten Immunsereen auftritt und sowohl bei den Gesamt-Ak als auch bei isolierten Fab-Ig G2 nachweisbar ist. (Siehe hierzu die Abb. 10a/b und 13a)

Die nur die Determinanten des Fc-Teils erfassenden absorbierten Antiseren zeigen dagegen dieses Phänomen nicht.

Einen weiteren Beweis für die Gleichheit der Fab-Teile beider Ak liefert die Abb. 16a, in der Anti-Fab-Ig G2 sowohl Fab-Ig G2 als auch Ig G1 präzipitiert, und die Präzipitationsbanden ohne Spornung oder Kreuzung ineinander übergehen.

Fab-Ig G2 und Fc-Ig G2 sind antigenetisch distincte Fragmente, wie die Abb. 13b gezeigt hat.

Die Fc-Teile von Ig G1 und Ig G2 sind nicht völlig verschieden: sie besitzen eine Verwandtschaft, die in der Abb. 15b zum Ausdruck kommt. Wurden nämlich monospezifisches, d.h. absorbiertes Anti-Ig G1 und Anti-Fc-Ig G2 in ihrem Präzipitationsverhalten gegenüber Ig G1 beobachtet, so ergab sich eine Spornung von monospezifischem Anti-Ig G1 über Anti-Fc-Ig G2. Damit ist die Verwandtschaft der beiden Fc-Teile nachgewiesen. Durch Absorption von Anti-Fc-Ig G2 an

Ig G1 läßt sich ein monospezifisches Anti-Fc-Ig G2 erzeugen, das nur noch mit Fc-Ig G2 präzipitiert. Dieses muß als mit dem monospezifischen Anti-Ig G2 identisches Antiserum angesehen werden, da sein Präzipitationsverhalten dem des durch Absorption an Ig G1 gewonnen Anti-Ig G2 entspricht.

Die folgende Abb. 17 will versuchen, das antigenetische Determinantenmuster, soweit es entwickelt wurde, schematisch zusammenfassen.

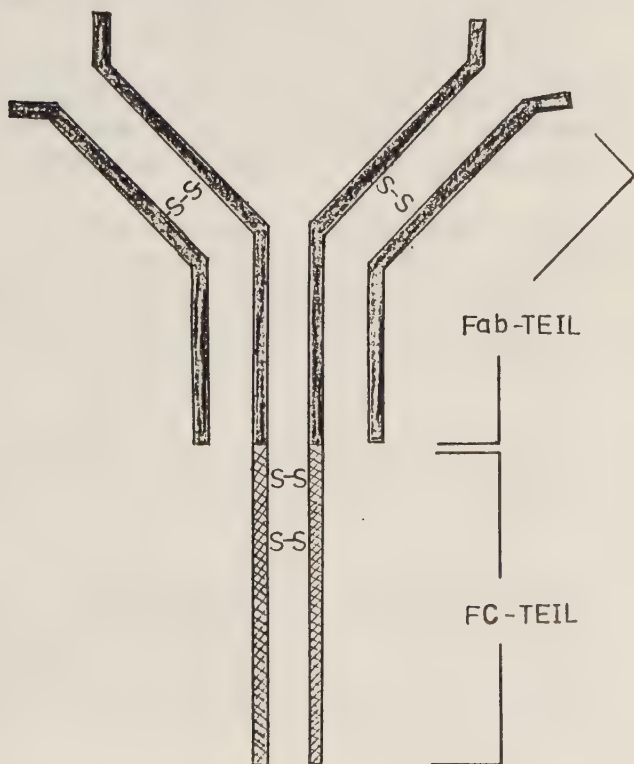


Abb.17 Schematische Darstellung des Antikörpermoleküls. Die bei Ig G1 und Ig G2 gleichen Abschnitte sind schwarz gezeichnet, während die verwandten Teile schraffiert dargestellt sind.

Die hier gefundenen Ergebnisse bestätigen die von Nussenzweig und Benaceraff gefundenen Daten der immunologischen Analyse der Immunglobuline Ig G1 und Ig G2. Die genannten Autoren fanden (35) sowohl für das Fab-Teil als auch für $F(ab)_2$ von Ig G1 und Ig G2 absolute Übereinstimmung der Moleküle mit der Doppeldiffusionstechnik. In Bezug auf das Fc-Stück fanden sie, daß die unterschiedlichen antigene-tischen Determinanten dort lokalisiert sind (37).

Die von Lamm und Lisowska-Bernstein durchgeführten Peptid-Mapping Untersuchungen der Ig G1 und Ig G2 (29) ergaben, daß im Bereich der Fab-Teile der Ak eine nahezu vollständige Übereinstimmung vorliegt, während im Bereich der Fc-Teile eine Gleichheit von etwa 50% der untersuchten Spots besteht.

Vuagnat (50) stellte für das Fc-Stück spezifische Antiseren dadurch her, daß er Antiseren, die durch die Injektion von elektrophoretisch reinen Ig G1 oder Ig G2 erzeugt worden waren, an Ig G2 bzw. Ig G1 absorbierte.

Nach den hier erhobenen Befunden handelt es sich bei diesen Antiseren tatsächlich um für den Fc-Ab-schnitt spezifische Antiseren.

In der Endphase der Arbeit kamen käufliche Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2 der Firma Nordic, Holland auf den Markt. Im Vergleich mit den hier hergestellten Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2 ergab sich, daß die Antiseren der Firma Nordic den absorbierten Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2 entsprechen.

Die in der Einleitung angesprochenen Subklassen der Ig G1 und Ig G2 konnten nicht entdeckt werden. Dafür gibt es zwei Erklärungen: durch die Tatsache, daß die erzeugten Antiseren gegen DNP-Konjugate aus gepoolten Meerschweinchenserum stammten, richteten sich die gegen das Meerschweinchenserum gerichteten Kaninchenantiseren

ebenfalls gegen den Serumpool. Es ist wahrscheinlich, daß die hier verwendeten Nachweismethoden (Immun-elektrophorese und Agargelddiffusion) für den Nachweis der Ig G-Subklassen zu grob sind.

Eine andere Erklärung ist, daß die Anti-Meerschweinchen Antiseren vom Kaninchen gegen einen Subklassen-Typ gerichtet sind. Dies kann damit zusammenhängen, daß die Antigenität der einzelnen Subklassen verschieden ist und das erzeugte Anti-Meerschweinchen-Antiserum hauptsächlich gegen eine Subklasse gerichtet ist.

Beim Durchsehen sämtlicher angefertigter Immunelektrophoresen fanden sich keine eindeutig auf Subklassen hinweisende Phänomene.

Mit der vorliegenden Arbeit sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um größere Mengen Ig G1 und Ig G2 rein zu erhalten. Darüberhinaus wurde das Antigen-Mosaik der Ig G1 und Ig G2 untersucht, was durch Ig G-Spaltprodukte und spezifische Anti-Meerschweinchen-Antiseren ermöglicht wurde.

Ungelöst bleibt die Frage der Anwendung der so erzeugten Ig G1 und Ig G2 sowie deren Spaltprodukte im biologischen Test

Ungelöst bleibt auch, wie sich die gegen HÜHNER-Erythrozyten gerichteten Ak im biologischen Test verhalten.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Meerschweinchen wurden mit DNP-HSA oder DNP-BGG immunisiert. Es wurde versucht, anhand von Literaturangaben aus den gewonnen Immunseren die Immunglobuline Ig G1 und Ig G2 abzutrennen. Die Reindarstellung der gesuchten Proteine mit der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie führte hier nicht zum Ziel: die Ig G1 konnten nicht ohne Verunreinigung mit Ig G2 erhalten werden.

Es wurden deshalb weitere Präparationsversuche zur Reindarstellung von Ig G1 und Ig G2 unternommen:

- zur Abtrennung von Nicht-Ak-Material: Protein A Immunabsorption an Anti-Ig G1 und Anti-Ig G2
- Präparative Elektrophorese (PEPH)
- Präparative isoelektrische Fokussierung (PIEF)

Am brauchbarsten erwies sich die PIEF in Kombination mit der Ionenaustauscherchromatographie. In kurzer Zeit lieferte sie ohne Aktivitätsverlust der Ak eine ausreichende Menge an Ig G1. Die anderen Verfahren schädigten die Ak in ihrer Aktivität erheblich.

Das gewonnene Ig G2 wurde mit Papain in seinen Fc- und Fab-Anteil gespalten. Eine Spaltung des Ig G1 mußte unterbleiben, da die präparierte Menge an Ig G1 für Spaltversuche zu gering war.

Gegen die immunelektrophoretisch reinen Ig G1, Ig G2, Fab-Ig G2 sowie gegen Fc-Ig G2 erzeugten Kaninchen Antiseren. Es zeigte sich, daß Anti-Ig G1 neben Ig G1 auch Ig G2 präzipitierte, Anti-Ig G2 neben Ig G2 auch Ig G1. Durch Absorption an Ig G2 erhielt man nur noch mit Ig G1 reagierende Antiseren, durch Absorption an Ig G1 solche, die nur noch mit Ig G2 reagierten.

Anti-Fab-Ig G2 präzipitierte Fab-Ig G2, Ig G2 und Ig G1, nicht jedoch Fc-Ig G2. Die an den Gesamtmolekülen absorbierten Antiseren zeigten keine Präzipitation mehr mit Fab-Ig G2, mussten somit den Fc-Teil erfassen.

Anti-Fc-Ig G2 erfasste neben Ig G2, Fc-Ig G2 auch Ig G1, nicht jedoch Fab-Ig G2. Wurde Anti-Fc-Ig G2 an Ig G1 depletiert, so erfasste es nur noch Ig G2 und Fc-Ig G2 und verhielt sich damit wie das durch das Gesamtmolekül induzierte und anschließend an Ig G1 depletierte Anti-Ig G2.

Aufgrund der erhobenen Befunde ergibt sich folgendes Determinantenmuster für Ig G1 und Ig G2:

die Fab-Teile sind identisch bei Ig G1 und Ig G2
die Fc-Teile verfügen über gleiche wie über
verschiedene Determinanten
durch Absorption am Gesamtmolekül lassen sich
Fc-spezifische Immunsereen herstellen.

Die gefundenen Ergebnisse stehen in Obereinstimmung mit den Angaben der Literatur.

VII L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1.) Berken, A., Benaceraff, B.: Properties of Antibodies Cytophilic for Macrophages, J. Exp. Med. 123, 1, 1966
- 2.) Benaceraff, B., Ovary, J., Block, K.J., Franklin, E.J.: Elektrophoretic Separation of 2 Types of 7 S Ig G, J. Exp. Med. 117, 937, 1963
- 3.) Binaghi, R.: Production of 7 S Immunoglobulins in Immunized Guinea Pigs, J. Immunology, 97, 159, 1968
- 4.) Block, K. J., Ovary, Z., Benaceraff, B.: Properties of Guinea Pig Antibodies, J. Exp. Med. 117, 965, 1963
- 5.) Boackle, R. J., Pruitt, K.M., Mestecky, J.: The Interactions of Human Complement with Interfacially Aggregated Preparations of Human Secretory Ig A, Immunochemistry, 11, 543, 1968
- 6.) Bratcher, R. L., Chong, C. A., Dray, S.: The Isolation and Charakterizing of an Anti-Sheep Red Blood Cell Antibody, Having Limited Heterogenity, J. Immunology, 112, 1337, 1974
- 7.) Burger, R., Hadding, U., Schorlemmer, H.U., Brade, V., Bitter-Suermann, D.: Dextran Sulphate: a Synthetic Activator of C3 via the Alternative Pathway, Immunology, 29, 549, 1975
- 8.) Capaldi, R.: A Cross-Linking Study of the Beef Erythrocyte Membrane: Extensive Interaction of All the Proteins of the Membrane Except for Glycoproteins, Biochemical and Biophysical Research Communications, 50, 656, 1973
- 9.) Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, B.: Mikrobiology, Hagerstown, New-York 1973

- 10.) Duncan, B. D., Stewart-Tull, J. P., Arbuthnott, P., Freer, J.: Some Properties of Ig G1 and Ig G2 Globulins from Normals and Adjuvant Stimulated Guinea Pigs, Immunochemistry, 12, 941, 1975
- 11.) Fearon, D. T., Austen, F.: Activation of the Alternative C-Pathway with Rabbit Erythrocytes by Circumvention of the Regulatory Action of Endogenous Control Proteins, J. Exp. Med., 146, 22, 1977
- 12.) Fearon, D.T., Austen, F.: Activation of the Alternative C-Pathway Due to Resistance to Endogenous Regulatory Mechanism, Immunology, 74, 1683, 1977
- 13.) Frank, M. M., Gaither, T., Adkinson, F., Terry, W. D., May, J. E.: Activation of the Alternative Complement Pathway by Human Immunoglobulins, J. Immunology, 116, 1733, 1976
- 14.) Furuichi, K., Kato, M., Nakamura, T., Koyoma, J.: Further Evidence for Preferential Production of Ig G2 Anti-DNP-Antibodies in Guinea Pig Immunized with DNP-Escherichia Coli, Immunochemistry, 13, 453, 1976
- 15.) Furuichi, K., Koyoma, J.: The Effect of Antigen Dose on the Amounts and Affinities of Guinea Pig Ig G1 and Ig G2 Anti-Hapten Antibodies, Immunochemistry, 13, 807, 1976
- 16.) Grabar, P., Burtin, P.: Immunelektrophoretische Analyse, Springer, Berlin, Heidelberg, New-York, 1964
- 17.) Hadding, U., Bitter-Suermann, D.: Das Komplement und seine Funktion, Deutsches Arzteblatt, 71, 932, 1974

- 18.) Humphrey, J., White, R. G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Thieme, Stuttgart, 1971
- 19.) Ishizaka, T., Soto, C., Ishizaka, K.: Charakterists of Complement Fixation by Aggregates Immunoglobulins, J. Immunology, 109, 1290,
- 20.) Krause, R., Braun, D.: The Individual Antigenic Spezifity of Antibodies to Streptococcal Carbohydrates, J. Exp. Med., 128, 969, 1968
- 21.) Kabat, E. A., and Mayers, M. M.: Experimental Immunochemistry, NewYork, 1971
- 22.) Kaplan, M. E., Dalmaso, A. P., Woodson, M.: Complement-Dependent Opsonisation of Incompatible Erythrocytes by Human Secretory Ig A, J. Immunology, 108, 275, 1972
- 23.) Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Thieme, Stuttgart, 1974
- 24.) Kay, A., Austen, K. F.: Antigen-Antibody Induced Cutaneous Eosinophilia in Complement Deficient Guinea Pigs, Clin. Exp. Immunology, 11, 37, 1972
- 25.) Jasin, H. E.: Human Heat Labile Opsonins: Evidence for their Mediation via the Alternative Pathway of Complement Activation, J. Immunology, 109, 26, 1972
- 26.) König, W., Okudaira, H., Ishizaka, K.: Spezific Binding of Mouse Ig E with Rat Mast Cells, J. Immunology, 112, 1652, 1974

König, W., Bitter-Suermann, D., Dierich, M., Hadding, U.: BypassActivation of the Complement System Starting with C3-II. C3-Activation by

Gamma-1-Immune Aggregates

- 27.) König, W., Bitter-Suermann, D., Dierich, M., Hadding, U.: Bypass-Activation of the Complement System Starting with C3-II. C3-Activation by Gamma-1-Immune Aggregates in Guinea Pig Serum, Immunochemistry, 10, 431, 1973
- 28.) König, W., Bitter-Suermann, D., Dierich, M., Limbert, M., Schorlemmer, H. U., Hadding, U.: DNP-Antigens Activate the Alternate Pathway of the Complement System, J. Immunology, 113, 501, 1974
- 29.) Lamm, M. E., Nussenzweig, V., Benaceraff, B.: Isolation of Purified H and L Polypeptide Chains from Guinea Pig Gamma 2- Immunoglobulin after Mild Reduction, Immunology, 10, 309, 1966
- 30.) Le Fever, J., Ishizaka, K.: Half Life of Guinea Pig Ig G1 and Ig G2 Immunoglobulins, J. Immunology, 108, 1698, 1972
- 31.) Leslie, R.G.Q., Cohen, S.: Cytophilic Activity of Ig G2 from Sera of Guinea Pigs immunized with Bovine GammaGlobulin, Immunology, 27, 589, 1974
- 32.) Leslie, R.G.Q., Cohen, S.: Chemical Properties of Guinea Pig Immunoglobulin Gamma 1, Gamma 2 and Gamma M, Biochem., 120, 787, 1970
- 33.) Leslie, R.G.Q., Melamed, V., Cohen, S.: The Products from Papain and Pepsin Hydrolysis of Guinea Pig Immunoglobulins Gamma 1 and Gamma 2, J. Biochem.: 121, 829, 1971
- 34.) Nakamura, T., Koyoma, J.: Variability Among Guinea Pig Antibody Populations by Varying the Immunizing Dose of Bacillus Subtilis Alpha-Amylase, Immunochemistry, 12, 931, 1975

- 35.) Nussenzweig, V., Benaceraff, B.: Presence of Identical Antigenic Determinants in the Fd-Fragments of Ig G1 and Ig G2 Guinea Pig Immunoglobulins, J. Immunology, 97, 171, 1966
- 36.) Nussenzweig, V., Benaceraff, B.: Synthesis and Structure and Specificity of γ S Guinea Pig Immunoglobulins, Gamma Globulins, Nobel-Symposium 3 Editor J. Killander, Uppsala, Sweden, 1967
- 37.) Nissonow, A., Hopper, S., Spring, S.: The Antibody Molecule, Academic Press, New-York-San-Francisco-London 1975
- 38.) Nissonow, A. Wissler, F.C., Lipman, L. N., Woernley, D.L.; Preparation of Univalent Fragments from the Bivalent Rabbit Antibody Molecule by Reduction of Disulfid Bonds, Archives of Biochemistry and Biophysics, 89, 230, 1960
- 39.) Oliveira, B., Osler, A., Siragamian, R.P., Sandberg, A.L.: The Biologic Activities of Guinea Pig Antibody, J. Immunology, 104, 320, 1969
- 40.) Osler, A., Oliveira, B., Shin, H.S., Sandberg, A.L.: The Fixation of Guinea Pig Complement by Ig G1 and Ig G2 Immunoglobulins, J. Immunology, 102, 269, 1969
- 41.) Perrin, L.H., Joseph, B.S., Cooper, N.R., Oldstone, M.B.A.: Mechanism of Injury of Virus Infected Cells by Antiviral Antibodies and Complement. Participation of Ig F(ab)₂ and the Alternative Complement Pathway, J. Exp. Med., 143, 1027 1976

- 42.) Reich, K.B.M.: Complement Fixation by the F(ab)₂ Fragment of Pepsin Treated Rabbit Antibodies, Immunology, 20, 649, 1971
- 43.) Sandberg, A.L., Osler, A.G.: Dual Parthways of Complement Interaction with Guinea Pig Immunoglobulins, Immunology, 107, 1268, 1971
- 44.) Sandberg, A.L., Oliveira, B., Osler, A.G.: Two Complement Interaction Sites in Guinea Pig Immunoglobulins, J. Immunology, 106, 282, 1971
- 45.) Sandberg, A.L., Synderman, R., Frank, M.M., Osler, A.G.: Production of chemotactic Activity by Guinea Pig Immunoglobulins following Activation of the C3 Complement Shunt Pathway, J. Immunology, 108, 1227, 1972 Sandberg,
- 46.) Sandberg, A.L., Götze, O., Müller-Eberhard, H.J., Osler, A.G.: Complement Utilisation by Guinea Pig Gamma 1 and Gamma 2 Immunoglobulins Through C3 Activation System, J. Immunology, 107, 920, 1971
- 47.) Sandberg, A.L., Shin, H.S., Osler, A.G., Oliveira, B.:a: The Biologic Activity of Guinea Pig Antibody. Modes of Complement Activation with Gamma 1 and Gamma 2 Immunoglobulins, J. Immunology, 104, 329, 1970
- 48.) Schur, P.H., Becker, E.L.: Pepsin Digestion of Rabbit and Sheep Antibodies. The Effect of Complement Fixation, J. Exp. Med., 118, 891, 1963
- 49.) Sjöquist, J., Forsgen, A., Gustavsson, G.T. et al: Interaction Between Gamma Globulins and Protein A from Staphylococcus Aureus, Nobel Symposion 3, 341, 1967, Editor: Killander, J., Almquist & Wiksell, Stockholm

- 50.) Vuagnat, P.: Further Studies on the Biologic Properties of Guinea Pig Ig G1 Antibodies, J. Immunology, 115, 787, 1975
- 51.) Wiesmann, E.: Medizinische Mikrobiologie, Thieme, Stuttgart, 1971
- 52.) Winkelstein, J.A., Shin, H.S., Wood, W.B.: Heat Labile Opsonins to Pneumococcus III. The Participation of Immunoglobulins and of the alternative Pathway of C3 Activation, J. Immunology, 108, 1681, 1972
- 53.) Yagi, Y., Mayer, P., Pressman, D.: Two Different Anti-Insulin Antibodies in Guinea Pig Antisera, J. Immunolgy, 89, 442, 1962
- 54.) Maillard, J.L., Voissin, L.A.; Elicitation of Arthus Reaction in Guinea Pigs by Homologous Ig G1 and Ig G2 Immunoglobulins, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 1188, 1970

Den Professoren Dr. D. Bitter-Suermann und Dr. U. Hadding danke ich für die Betreuung während des experimentellen Teils und das unermüdliche Lesen der Korrektur.

Herrn Professor Dr. W. König aus dem Institut danke ich für manchen guten Rat.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. K. Kob, Röntgenfacharzt in Mainz-Kostheim verpflichtet, der mir seinen Schreibautomaten zur Verfügung stellte.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 24. April 1952 in Mainz als Sohn des Industriekaufmanns Wilhelm Weyer und seiner Ehefrau Katharina geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Brüder-Grimm-Schule in Mainz-Kostheim, um an Ostern 1963 an das humanistische Rabanus-Maurus-Gymnasium in Mainz zu wechseln. Dort bestand ich im Mai 1971 die Reifeprüfung.

Infolge Numerus clausus konnte ich nicht sofort mit dem gewünschten Medizinstudium beginnen, so daß ich zunächst an der Mainzer Universität Physik studierte. Zum Wintersemester 1973 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Universität zu Köln, wo ich unter Anrechnung meines Physikstudiums im März 1975 das Physikum bestand.

Zum Sommersemester 1975 wechselte ich an die Universität Mainz, wo ich noch im gleichen Sommer mit meiner Doktorarbeit begann. Im Frühjahr 1976 bestand ich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Im Juli 1977 heiratete ich die Apothekerin Rosemarie Storz.

Im Frühjahr 1978 bestand ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und absolvierte darauf an den Städt. Kliniken Wiesbaden das sog. Praktische Jahr mit dem Wahlfach Gynäkologie.

Mein Berufsziel ist es, Facharzt für Unfallchirurgie zu werden.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'H. Weyer', is written at the bottom of the page.

Druck: Reinartz

Copier- und Offset-Center

Gaustraße 16, Telefon 061 31/9 3870 + Kirchgarten 3, Telefon 061 31/9 62 02
6500 Mainz

